



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

VALORACIÓN DEL ESTADO DE MICRONUTRIENTES Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON FENILCETONURIA

Vanesa Crujeiras Martínez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Valoración del estado de micronutrientes y riesgo cardiovascular en pacientes con fenilcetonuria

Dña. Vanesa Crujeiras Martínez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago, 26 de enero de 2019

Fdo.: Vanesa Crujeiras Martínez





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

Valoración del estado de micronutrientes y riesgo cardiovascular en pacientes con fenilcetonuria

Dña. M^o Luz Couce Pico

Dña. Maria Rosaura Leis Trabazo

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Vanesa Crujeiras Martínez**, bajo nuestra dirección, y autorizan su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago, 26. de enero de 2019

Fdo: M^o Luz Couce Pico

Dña. M^a.Rosaura Leis Trabazo



AGRADECIMIENTOS:

Todo camino, por muy largo que sea lleva algún destino, esta Tesis Doctoral ha sido un largo recorrido, con sus curvas y sus tropiezos, pero finalmente he conseguido llegar a una meta.

Han sido muchas las personas que me han acompañado a lo largo de este viaje y me gustaría darles mi más profundo y sincero agradecimiento a todas ellas.

A la Dra. M^o Luz Couce y a la Dra. Rosaura Leis por haber confiado en mí, por orientar mis pasos hacia el mundo de la Nutrición, por su insistencia, sus consejos y su paciencia infinita.

Al Dr. Álvaro Hermida por su gran colaboración, por sus enseñanzas y por abrirme camino hacia el mundo de la hipertensión.

A la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago por todo su trabajo.

A todos los pacientes y sus familiares, ya que sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.

A todo el equipo de Pediatría, en especial a mis compañeras y amigas de la Unidad de Gastroenterología Nazareth, Rebeca y las Rocío, que tanto me han animado en esos momentos donde las curvas me hacían salir del sendero.

A nuestro secretario Manuel por facilitarme la convivencia con la informática.

Y como no, a las personas más importantes en mi vida. A Javi, por ser mi compañero, por su paciencia y por ser el bastón en el que apoyarme durante mis tropiezos. A Nico y a mis sobrinos Iago y Anxo por enseñarme lo que es realmente importante en la vida. A mis padres, por su entrega, devoción y apoyo incondicional. Muy especialmente a mi hermana, que tantas veces me ha allanado el camino, gran parte de mis éxitos no hubiesen sido posibles sin su ayuda.

No podía finalizar estos agradecimientos sin nombrar a mis tíos Suca y José, mi prima Fany, mi abuelo, mi cuñado Ángel, a la familia de Javi y amigos, gracias a su apoyo y ánimo he conseguido llegar al final de este trayecto.



*Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano.*

*Isaac Newton
(1643-1727)*





ÍNDICE

ABREVIATURAS:	1
RESUMEN	3
RESUMO	7
ABSTRACT	11
1 INTRODUCCIÓN	16
1.1 DEFINICIÓN DE FENILCETONURIA	16
1.2 HISTORIA	19
1.3 EPIDEMIOLOGÍA	22
1.4 GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE LA PAH	23
1.5 FISIOPATOLOGÍA:.....	26
1.6 CLASIFICACIÓN	30
1.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	33
1.8 DIAGNÓSTICO	35
1.8.1 Cribado neonatal	35
1.8.2 Confirmación diagnóstica.....	36
1.8.2.1 Test de sobrecarga de BH4	39
1.8.2.2 Estudio genético.....	40
1.9 TRATAMIENTO	41
1.9.1 Consideraciones generales:	41
1.9.2 Tratamiento dietético:.....	41
1.9.2.1 Objetivos del tratamiento.	43
1.9.2.2 Indicaciones de Tratamiento:	43
1.9.3 Otras opciones de tratamiento:	44
1.9.4 Otras posibilidades de tratamiento	45
1.10 SEGUIMIENTO:	49
1.11 EVOLUCIÓN	53
1.12 VITAMINAS Y MINERALES EN FENILCETONURIA	55
1.12.1 Vitamina B ₁₂ :.....	56

1.12.2	Ácido fólico.....	58
1.12.3	Selenio.....	59
1.12.4	Zinc.....	59
1.12.5	Hierro	60
1.12.6	Calcio, fósforo y vitamina D	61
1.13	ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	63
1.13.1	Valoración de la presión arterial	63
1.13.2	La rigidez arterial	64
1.13.3	Tonometría de aplanamiento	66
1.13.3.1	Forma de la onda de presión de pulso	68
1.13.3.2	Velocidad de la onda de pulso	73
1.13.4	La rigidez arterial y patologías con riesgo cardiovascular	74
2	JUSTIFICACIÓN	79
3	OBJETIVOS.....	83
4	PACIENTES Y MÉTODO.....	87
4.1	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.	87
4.1.1	Diseño del estudio:.....	87
4.1.2	Sujetos:	87
4.1.3	Ámbito del estudio:	88
4.1.4	Variables de estudio:	88
4.1.5	Planificación del estudio:	89
4.1.6	Método:	89
4.1.7	Análisis estadístico:.....	91
4.2	VALORACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON FENILCETONURIA MEDIANTE LA MEDICIÓN DEL GRADO DE RIGIDEZ ARTERIAL.	92
4.2.1	Diseño del estudio:.....	92
4.2.2	Sujetos:	92
4.2.3	Ámbito del estudio:	93
4.2.4	Variables de estudio:	93
4.2.5	Planificación del estudio:	94

4.2.6	Método:	94
4.2.7	Análisis estadístico:	97
4.3	ASPECTOS ÉTICO-LEGALES	97
5	RESULTADOS.....	101
5.1	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.	101
5.1.1	Características de los sujetos:.....	101
5.1.2	Valoración antropométrica	102
5.1.3	Valoración dietética y nutricional	102
5.2	EVALUACIÓN DE LA RIGIDEZ ARTERIAL MEDIANTE TONOMETRÍA POR APLANAMIENTO EN PACIENTES CON FENILCETONURIA.....	117
5.2.1	Características de los sujetos:.....	117
5.2.2	Antropometría y perfil lipídico.....	121
5.2.3	Valoración del grado de rigidez arterial	124
6	DISCUSIÓN	137
6.1	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.	137
6.2	EVALUACIÓN DE LA RIGIDEZ ARTERIAL MEDIANTE TONOMETRÍA POR APLANAMIENTO EN PACIENTES CON FENILCETONURIA.....	144
7	CONCLUSIONES:	157
8	BIBLIOGRAFÍA.....	161



ABREVIATURAS:

25-OH VitD:	25- hidroxí vitamina D
5-HT:	5-hidroxitriptófano
AA:	aminoácidos
ADMA:	dimetilarginina asimétrica
AECOM:	Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo.
AIX:	índice de aumento o índice de potenciación.
AIXHR@75:	índice de aumento o índice de potenciación ajustado según frecuencia cardíaca de 75 lpm
AMM:	ácido metilmalónico
AP:	incremento sistólico de presión
AR:	aldolasa reductasa
Arg:	arginina
BBB:	barrera hematoencefálica.
BH4:	(6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
Ca:	calcio.
CC:	circunferencia de cintura
CPKU:	fenilcetonuria clásica
CVRS:	Calidad de vida relacionada con la salud
DE:	desviación estándar
DHPR:	dihidropterina reductasa
DMO:	densidad mineral ósea
EIM:	errores innatos del metabolismo
EMH:	enfermedad metabólica hereditaria
ESC:	Sociedad Europea de Cardiología
ESH:	Sociedad Europea de Hipertensión
FC:	frecuencia cardíaca
FDA:	Food and Drug Administration
Fe:	hierro
GMP:	glucomacropéptido.
GTP:	Trifosfato de Guanosina.
GTPCH:	Guanosín trifosfato ciclohidrolasa I
Hb:	hemoglobina
Hcy:	homocisteína.
HDL:	lipoproteína de alta densidad.
HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A.
HMV:	ácido homovanílico.
HPA:	hiperfenilalaninemia.
IDF:	Federación Internacional de diabetes
IMC:	índice de masa corporal.
LAT 1:	L-aminoácido transportador 1
LCR:	líquido cefalorraquídeo
LDL:	lipoproteína de baja densidad.

LNAA:	aminoácidos neutros de gran tamaño (triptófano, tirosina, leucina, isoleucina, valina)
MHPA:	hiperfenilalaninemia benigna.
MMA-CoA:	metilmalonil CoA reductasa
MPKU:	fenilcetonuria leve-moderada
MS/MS:	espectrometría de masas en tandem
MTHF:	metiltetrahidrofolato.
NADH:	nicotinamida adenina dinucleótido reductasa.
NADPH :	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NHBPEP:	National High Blood Pressure Education Program
P:	fósforo
PA:	presión arterial
PAD:	presión arterial diastólica
PADc:	presión arterial diastólica central
PAH:	fenilalanina hidroxilasa
PAH:	gen que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa.
PAL:	fenilalanina-amonio liasa.
Palb:	Prealbúmina
PAM:	presión arterial media
PAS:	presión arterial sistólica
PASc:	presión arterial sistólica central
PCD:	Pterina-4acarbinolamina dehidratasa.
Phe:	fenilalanina.
PKU:	fenilcetonuria.
PP:	presión de pulso
PPc:	presión de pulso central
PT:	proteínas totales
PTH:	Parathormona
PTPS:	6 piruvoil tetrahidropterina sintasa
PWA:	forma de la onda de pulso
RDA:	recomendaciones dietéticas asignadas
RDI:	Ingesta diaria recomendada
Se:	selenio.
SEVR:	índice de viabilidad subendocárdica
SR:	sepiapterina reductasa
SUC-CoA:	Succinil-CoA
TA:	tonometría de aplanamiento
TH:	tirosina hidroxilasa
THF:	tetrahidrofolato
TPH:	triptófano hidroxilasa
Trp:	triptófano
Tyr:	tirosina
VCM:	volumen corpuscular medio
Vit B₁₂:	vitamina B ₁₂
VM:	vitaminas y minerales
VOP:	velocidad de onda de pulso carótido-femoral
Zn:	zinc

RESUMEN

Los pacientes diagnosticados de fenilcetonuria (PKU), a pesar de un adecuado cumplimiento del tratamiento, presentan alto riesgo de padecer desequilibrios nutricionales, tanto por exceso como por defecto, así como un incremento del riesgo de desarrollar aterosclerosis.

El objetivo de esta tesis doctoral es valorar el estado nutricional de los pacientes con hiperfenilalaninemia y determinar el grado de rigidez arterial como medida no invasiva de riesgo cardiovascular.

Se llevaron a cabo dos estudios observacionales de corte transversal. En uno de ellos se incluyeron un total de 156 pacientes con hiperfenilalaninemia que fueron seguidos en 3 Centros con Unidad de Referencia Nacional de Enfermedades Metabólicas Hereditarias. Los pacientes fueron clasificados atendiendo a la edad y el sexo, momento del diagnóstico, fenotipo de PKU según los niveles plasmáticos de fenilalanina (Phe) al diagnóstico (PKU clásica (CPKU) si $>1200 \mu\text{mol/L}$, PKU leve-moderada (MPKU) $360-1200 \mu\text{mol/L}$ e hiperfenilalaninemia leve (MHPA) $120-360 \mu\text{mol/L}$), genotipado, prescripción de tratamiento dietético y tratamiento con sapropterina. En todos los pacientes se recogieron medidas antropométricas, tolerancia de Phe (baja $<500\text{mg/día}$ y alta $>500 \text{mg/día}$), mediana de fenilalanina en el último año ($\mu\text{mol/L}$) como medida de control metabólico y determinaciones bioquímico nutricionales, prealbúmina (Palb), proteínas totales (PT), Selenio (Se), Zinc (Zn), 25-hidroxi vitamina D (25-OH VitD), calcio (Ca), fósforo (P), vitamina B₁₂ (Vit B₁₂), ácido fólico, ferritina y ácido metilmalónico (AMM).

En el segundo estudio se incluyeron 41 pacientes diagnosticados de PKU y 41 controles con diagnóstico negativo, de características similares en cuanto a edad y sexo. Ambos grupos fueron tratados en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Las variables recogidas incluyeron edad, sexo, parámetros antropométricos, fenotipo PKU, genotipado, mediana anual de los niveles de Phe, tratamiento con sapropterina, perfil lipídico (colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos) y presión arterial (PA). Se valoró la rigidez arterial mediante la tonometría de aplanamiento con

obtención de la PA central, el índice de aumento o potenciación (Aix) y la velocidad de onda de pulso (VOP).

En el primer estudio se observó que el 43,6 % de los pacientes no tenían un índice de masa corporal (IMC) adecuado. Se encontraron niveles alterados de micronutrientes en el 81,4% de los sujetos, sin presentar ningún paciente manifestaciones clínicas. Los niveles de PT, Ca, P, vit B₁₂ y AMM estaban dentro del rango normal en casi todos los pacientes. Sin embargo, un gran porcentaje de pacientes presentaban niveles alterados de Se (25% de los pacientes, 76,9% de ellos con adecuada adherencia a la dieta), Palb (34.6% de los pacientes, 96,3% de ellos con adecuada adherencia a la dieta y 94,4% en menores de 18 años), 25-OH VitD (14% de los pacientes 86,4% adecuada adherencia a la dieta) y ácido fólico (39% de los pacientes, 81,9% con adecuada adherencia a la dieta). Los niveles de estos parámetros se hallaron todos por debajo del rango considerado como normal, a excepción del ácido fólico que se encontraba por encima de los niveles normales.

Cuando comparamos los fenotipos principales de fenilcetonuria, observamos que los niveles de Se y P estaban más bajos en los pacientes con PKU (Se 78,3 vs 67,9 µg/dL, p=0,003 y P 4,7 vs 4,3 mg/dL; p=0,005) que los pacientes con MHPA. Por otro lado, los pacientes con CPKU presentaban niveles más elevados de vit B₁₂ y Zn (vit B₁₂ 739,6 vs 587,6 pg/mL; p=0,004 y Zn 88,9 vs 81,3 µg/dL; p=0,03) que los pacientes MHPA + MPKU considerados como un grupo.

Cuando los pacientes fueron categorizados en función del tratamiento, observamos que los sujetos con baja adherencia a la dieta presentaban niveles de vit B₁₂ y P más bajos (vit B₁₂ 628 vs 679 pg/mL; p=0,03 y P 3,3 vs 4,5 vs mg/dL; p<0,001), mientras que los niveles de Palb y PT fueron más elevados (Palb 29 vs 22,6 mg/d; p<0,001 y PT 7,3 vs 7,1 g/dL; p <0,001).

Además, también pudimos observar que los pacientes que recibían tratamiento con BH4 presentaban niveles inferiores de vit B₁₂ (536 vs 694 pg/mL).

En el segundo estudio observamos una correlación lineal positiva de la mediana de Phe y el peso (r=0,60; p<0,001), IMC (r=0,46; p=0,005) y la circunferencia de cintura (r=0,38; p=0,036). Los niveles de HDL, LDL y colesterol total tendieron a ser más bajos

en los pacientes con PKU, si alcanzar significación estadística cuando se compararon con el grupo control.

El estudio de la rigidez arterial mediante la tonometría de aplanamiento evidenció que el porcentaje de pacientes con PKU que presentaban VOP por encima del percentil 90 era mayor que en los controles (14,6 vs 2,32%; $p=0,048$). De acuerdo al fenotipo de PKU, los pacientes con CPKU presentaron valores VOP (6,60 m/seg) mayores que los pacientes con MPKU (5,30 m/seg; $p=0,07$) y mayores que los controles (5,26 m/seg, $p=0,044$). Además, observamos una correlación lineal entre la mediana anual de Phe y la VOP ($r=0,49$; $p=0,012$).

En cuanto al tratamiento, los sujetos con menor tolerancia de Phe mostraron una VOP mayor que los que toleraban mayor cantidad de Phe (6,55 m/seg vs 5,42 m/seg; $p=0,044$) y los pacientes tratados con BH4 también presentaban una VOP menor que los que sólo recibían restricción dietética (4,85 m/seg vs 6,23 m/seg, $p=0,034$).

En conclusión, este trabajo evidenció una alteración en diversos micronutrientes, bien por exceso como puede ser el ácido fólico o por defecto como el selenio, siendo más frecuente en pacientes con mayor restricción de proteínas de alto valor biológico, a pesar de realizar un adecuado cumplimiento dietético. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de considerar el ajuste de estos micronutrientes en los estándares internacionales de los suplementos de aminoácidos libres de fenilalanina.

En cuanto a la valoración del riesgo cardiovascular, en comparación con los controles sanos, los pacientes con PKU presentan una rigidez aórtica mayor, medida de forma no invasiva por la velocidad de onda de pulso carotídeo-femoral. Estos hallazgos mostraron que los pacientes con PKU, que se adherieron estrictamente a su dieta y aquellos bajo tratamiento con sapropterina, tienen menor riesgo de desarrollar aterosclerosis ya que mostraron una VOP más baja. Desde nuestro conocimiento, hemos sido pioneros en utilizar esta técnica en los pacientes PKU y consideramos que, la tonometría de aplanamiento podría ser de utilidad para monitorizar y estratificar el riesgo cardiovascular de los pacientes con PKU y como una posible guía para una terapia personalizada.



RESUMO

Os pacientes diagnosticados de fenilcetonuria (PKU), a pesar de un adecuado cumprimento do tratamento, presentan alto risco de padecer desequilibrios nutricionais, tanto por exceso como por defecto, así como un incremento do risco de desenvolver aterosclerose.

O obxectivo de esta tese doutoral é valorar o estado nutricional dos pacientes con hiperfenilalaninemia e determinar o grado de rixidez arterial como medida non invasiva de risco cardiovascular.

Leváronse a cabo dous estudos observacionais de corte transversal. Nun deles incluíronse un total de 156 pacientes con hiperfenilalaninemia que foron seguidos en 3 Centros con Unidade de Referencia Nacional de Enfermidades Metabólicas Hereditarias. Os pacientes foron clasificados segundo a idade, o sexo, momento do diagnóstico, fenotipo de PKU dependendo dos niveis plasmáticos de fenilalanina (Phe) ao diagnóstico (PKU clásica (CPKU) si $>1200 \mu\text{mol/L}$, PKU leve-moderada (MPKU) $360\text{-}1200 \mu\text{mol/L}$ e hiperfenilalaninemia leve (MHPA) $120\text{-}360 \mu\text{mol/L}$), xenotipado, prescrición de tratamento dietético e tratamento con sapropterina. En todos os pacientes recolléronse medidas antropométricas, tolerancia de Phe (baixa $<500\text{mg/día}$ e alta $>500 \text{mg/día}$), mediana de fenilalanina no último ano ($\mu\text{mol/L}$) como medida de control metabólico e determinacións bioquímico nutricionais: prealbúmina (Palb), proteínas totais (PT), Selenio (Se), Zinc (Zn), 25-hidroxi vitamina D (25-OH VitD), calcio (Ca), fósforo (P), vitamina B₁₂ (Vit B₁₂), ácido fólico, ferritina e ácido metilmalónico (AMM)).

No segundo estudio incluíronse 41 pacientes diagnosticados de PKU e 41 controis con diagnóstico negativo, de características similares en cuanto a idade e sexo. Ambos grupos foron tratados no Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. As variables recollidas incluíron idade, sexo, parámetros antropométricos, fenotipo PKU, xenotipado, mediana anual dos niveis de Phe, tratamento con sapropterina, perfil lipídico (colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicéridos) e presión arterial (PA). Valorouse a rixidez arterial

mediante a tonometría de aplanamento con obtención da PA central, o índice de aumento ou potenciación (Aix) e a velocidade da onda de pulso (VOP).

No primeiro estudo observouse que o 43,6 % dos pacientes non tiñan un índice de masa corporal (IMC) adecuado. Atopáronse niveis alterados de micronutrintes no 81,4% dos suxeitos, sen presentar ningún paciente manifestacións clínicas. Os niveis de PT, Ca, P, vit B₁₂ e AMM estaban dentro do rango normal en case todos os pacientes. Sen embargo, un gran porcentaxe de pacientes presentaban niveis alterados de Se (25% dos pacientes, 76,9% deles con adecuada adherencia á dieta), Palb (34,6% dos pacientes, 96,3% deles con adecuada adherencia á dieta e 94,4% en menores de 18 anos), 25-OH VitD (14% dos pacientes, 86,4% adecuada adherencia á dieta) e ácido fólico (39% de los pacientes, 81,9% con adecuada adherencia á dieta). Os niveis destes parámetros atopáronse todos por debaixo do rango considerado como normal, a excepción do ácido fólico que se atopaba por encima dos niveis normais.

Cando comparamos os fenotipos principais de fenilcetonuria, observamos que os niveis de Se e P estaban máis baixos nos pacientes con PKU (Se 78,3 vs 67,9 µg/dL, p=0,003 e P 4,7 vs 4,3 mg/dL; p=0,005) que os pacientes con MHPA. Por outro lado, os pacientes con CPKU presentaban niveis máis elevados de vit B₁₂ e Zn (vit B₁₂ 739,6 vs 587,6 pg/mL; p=0,004 e Zn 88,9 vs 81,3 µg/dL; p=0,03) que os pacientes MHPA + MPKU considerados como un grupo.

Cando os pacientes foron categorizados en función do tratamento, observamos que os suxeitos con baixa adherencia á dieta presentaban niveis de vit B₁₂ e P máis baixos (vit B₁₂ 628 vs 679 pg/mL; p=0,03 e P 3,3 vs 4,5 mg/dL; p<0,001), mentres que os niveis de Palb e PT foron máis elevados (Palb 29 vs 22,6 mg/d; p<0,001 e PT 7,3 vs 7,1 g/dL; p <0,001). Ademais, tamén puidemos observar que os pacientes que recibían tratamento con BH4 presentaban niveis inferiores de vit B₁₂ (536 vs 694 pg/mL).

No segundo estudio observamos una correlación lineal positiva da mediana de Phe e o peso (r=0,60; p<0,001), IMC (r=0,46; p=0,005) e a circunferencia de cintura (r=0,38; p=0,036). Os niveis de HDL, LDL e colesterol total tenderon a ser máis baixos nos pacientes con PKU, sen alcanzar significación estadística cando se compararon con grupo control.

O estudio da rixidez arterial mediante a tonometría de aplanamento evidenciou que o porcentaxe de pacientes con PKU que presentaban VOP por encima do percentil 90 era maior que nos controis (14,6 vs 2,32%; $p=0,048$). De acordo ó fenotipo de PKU, os pacientes con CPKU presentaron valores VOP (6,60 m/seg) maiores que os pacientes con MPKU (5,30 m/seg; $p=0,07$) e maiores que os controis (5,26 m/seg, $p=0,044$). Ademais observamos unha correlación lineal entre a mediana anual de Phe e a VOP ($r=0,49$; $p=0,012$).

En canto ao tratamento, os suxeitos con menor tolerancia de Phe mostraron unha VOP maior que os que toleraban maior cantidade de Phe (6,55 m/seg vs 5,42 m/seg; $p=0,044$) e os pacientes tratados con BH4 tamén presentaban unha VOP menor que os que solo recibían restrición dietética (4,85 m/seg vs 6,23 m/seg, $p=0,034$).

En conclusión, este traballo evidenciou unha alteración en diversos micronutrintes, ben por exceso como poido ser o ácido fólico ou por defecto como o selenio, sendo máis frecuente en pacientes con maior restrición de proteínas de alto valor biolóxico, a pesar de realizar un adecuado cumprimento dietético. Estes resultados poñen de manifesto a necesidade de considerar o axuste de estes micronutrintes nos estándares internacionais dos suplementos de aminoácidos libres de fenilalanina.

En cuanto á valoración do risco cardiovascular, en comparación cos controis sanos, os pacientes con PKU presentan unha rixidez aórtica maior, medida de forma non invasiva pola velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral. Estes achados amosaron que os pacientes con PKU, que se adheriron estritamente á dieta e aqueles baixo tratamento con sapropterina, teñen menor risco de desenrolar aterosclerose xa que mostraron unha VOP máis baixa. Desde o noso coñecemento, fomos pioneiros en utilizar esta técnica nos pacientes PKU e consideramos que, a tonometría de aplanamento podería ser de utilidade para monitorizar e estratificar o risco cardiovascular dos pacientes con PKU e como unha posible guía para unha terapia personalizada.



ABSTRACT

Patients diagnosed with phenylketonuria (PKU), in spite of good adherence to treatment, present high risk of nutritional dysbalances (by excess or by defect), as well as potential risk of atherosclerosis. Thus, the aim of this Doctoral Thesis was to evaluate the nutritional status of patients with hyperphenilalaninemia and arterial stiffness assessment as a noninvasive measurement of cardiovascular risk.

Observational and transversal studies were carried out. In a first study, 156 patients diagnosed with hyperphenilalaninemia, followed in 3 centers weight National Reference Unit for Inherited Metabolic Diseases were included. Patients were categorized according to age and gender and PKU phenotype (classic PKU (CPKU) with >1200 $\mu\text{mol/L}$ of serum phenylalanine (Phe) concentration at diagnosis; PKU mild-moderate (MPKU) with $360\text{--}1200$ $\mu\text{mol/L}$; mild hyper-Phe (MHPA) with $120\text{--}360$ $\mu\text{mol/L}$), genotype, time at diagnosis, dietary treatment and sapropterin treatment. Anthropometric measurements, Phe tolerance (low <500 mg/day and high >500 mg/day), median of Phe in the last year ($\mu\text{mol/L}$) as markers of metabolic control as well as biochemical parameters such as prealbumin (Palb), total protein (TP), Selenium (Se), Zinc (Zn), 25-hydroxy vitamin D (25-OH VitD), calcium (Ca), phosphorus (P), vitamin B₁₂ (Vit B₁₂), folic acid, ferritin and methylmalonic acid (AMM).

In the second study, 41 PKU diagnosed patients and 41 healthy subjects were included matched by age and gender. Patients were from the Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Measurements of age, gender, anthropometric parameters, PKU phenotype, genotype, annual Phe median, treatment with sapropterin, lipid profile (high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low density lipoprotein-cholesterol (LDL), total cholesterol and triglycerides), and arterial pressure (AP). Moreover, aortic stiffness was assessed noninvasively by applanation tonometry measuring central blood pressure (PAc), aortic augmentation index (Aix) and pulse wave velocity (PWV).

The first study evidenced that 43.6% of patients showed inadequate body mass index (BMI). Most of the patients (81.4%) showed altered levels of micronutrients, without clinical evidences. Levels of PT, Ca, P, vit B₁₂, AMM were within the normal range in most of the patients. By contrast, other parameters were out of the normal range. These parameters were Se (25% of patients with altered levels, 76.9% with good adherence to

diet), Palb (34.6% patients with altered levels, 96.3% with good adherence to diet and 94.4% of patients were lower than 18 years old), 25-OH VitD (14% of patients with altered levels, 86.4% good adherence to diet) and folic acid (39% of patients with altered levels, 81.9% with good adherence to diet). All of these parameters were under the normal range except folic acid that was up to the normal range.

When the MHPA vs PKU phenotypes were compared, levels of Se and P were lower in PKU than MHPA (Se 78.3 vs 67.9 $\mu\text{g/dL}$; $p=0.003$ y P 4.7 vs 4.3 mg/dL ; $p=0.005$). Moreover, when compared patients MHPA+MPKU with CPKU patients we observed that vit B₁₂ and Zn were higher in CPKU patients (vit B₁₂ 739.6 vs 587.6 pg/mL ; $p=0.004$ y Zn 88.9 vs 81.3 $\mu\text{g/dL}$; $p=0.03$).

Regarding to the adherence to diet, subjects with low adherence showed lower vit B₁₂ and P (vit B₁₂ 628 vs 679 pg/mL ; $p=0.03$ y P 3.3 vs 4.5 mg/dL ; $p<0.001$) as well as higher Palb and PT (Palb 29 vs 22.6 mg/d ; $p<0.001$ y PT 7.3 vs 7.1 g/dL ; $p<0.001$). Moreover, vit B₁₂ was lower in patients treated with BH4 (536 vs 694 pg/mL).

The second study evidenced a positive correlation between the Phe median and body weight ($r=0.6$; $p<0.001$, BMI ($r=0.46$; $p=0.005$) and waist circumference ($r=0.38$; $p=0.036$). Moreover, a trend for decreased levels in HDL, LDL and total cholesterol was observed without statistical significance when comparing patients with control subjects.

When the arterial stiffness was evaluated by applanation tonometry, it was observed that the percent of subjects with PWV higher than 90 percentil was higher in PKU (14.6% vs 2.32%; $p=0.048$) patients and CPKU (6.60 vs 5.30 m/seg ; $p=0.07$) and MPKU (6.60 m/seg vs 5.26 m/seg , $p=0.044$) patients than in the control group.

PWV was also correlated with annual Phe median ($r=0.49$; $p=0.012$). Moreover, PWV units were higher in patients with good tolerance to treatment with high Phe levels (6.55 m/seg vs 5.42 m/seg ; $p=0.044$) and lower in patients treated with BH4 (4.85 m/seg vs 6.23 m/seg , $p=0.034$) as compared with patients with low tolerance to high levels of Phe treatment or only dietary restriction, respectively.

In conclusion, this work evidenced alteration in several micronutrients by excess such as occur with folic acid or by defect such as occur with Se. This dysbalance was observed in patients with high biological value proteins despite good adherence to diet.

It suggest that an adjustment of the micronutrients in the aminoacid supplementation free of phenylalanine should be considered in the international guides.

Regarding to the cardiovascular risk, PKU patients with a good adherence to diet and under sapropterin treatment, are at lower risk of developing atherosclerosis. These results were found by determining the arterial stiffness with applanation tonometry, a non-invasive tool that could be useful for serial monitoring and risk stratification of PKU patients in order to design a personalized treatment.





INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE FENILCETONURIA

La fenilcetonuria (PKU) es un error innato del metabolismo (EIM) de herencia autosómica recesiva (OMIN 26100, CIE-10 E70.0) debido a una alteración en la reacción enzimática de hidroxilación de la fenilalanina (Phe) en el 98-99% de los casos y en el 1-2% por alteración de su cofactor.

La causa más frecuente de la hiperfenilalaninemia (HPA) es debida a mutaciones en el gen que codifica la fenilalanina 4-monooxigenasa (*PAH*) (PAH: EC 1.14.16.1) que interfiere exclusivamente en la hidroxilación hepática de la fenilalanina por la deficiencia de la enzima PAH, pero también se han descrito en 1-2% de los casos deficiencias en el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) de esta enzima (en la enzima dihidrobiopterina reductasa DHPR, EC 1.6.99.7) o en enzimas implicadas en la biosíntesis y reciclaje del cofactor¹ las cuales tienen también repercusión en la síntesis de neurotransmisores dopa y serotoninérgicos (Figura 1).

Recientemente se ha descrito un nuevo defecto en una molécula que actúa como co-chaperona, junto con la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), responsable del plegamiento adecuado de la PAH. Esta molécula codificada en el gen *DNAJC12* también actúa como chaperona de la tirosina hidroxilasa (TH: EC 1.14.16.2) y la triptófano hidroxilasa (THP: EC 1.1.4.16.4). Los pacientes en los que se ha identificado esta mutación responden a la administración de BH4, L-dopa/carbidopa y 5-hidroxitriptófano^{2,3}.

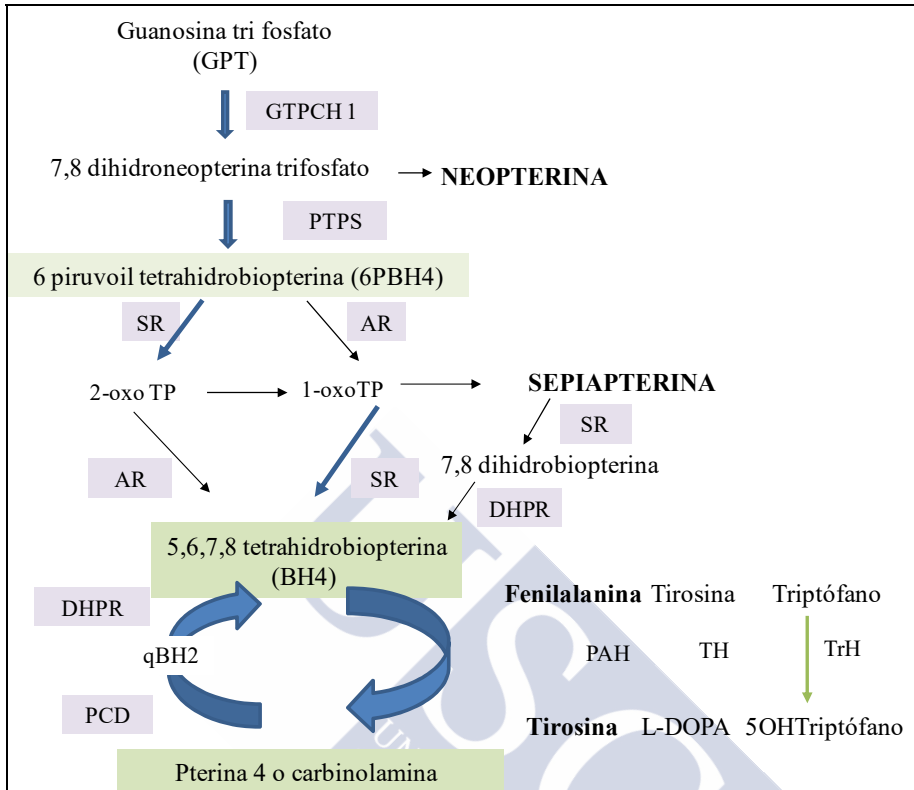


Figura 1: Metabolismo de la fenilalanina y de la BH4. (Lila) Enzimas implicadas en la síntesis y reciclaje de la BH4, GTPCH: guanosina trifosfato ciclohídrólase, PTPS: 6 piruvil tetrahidropterina sintasa, PCD: Pterin-4ácabinolamina dehidratasa. SR: sepiapterina reductasa, AR: aldolasa reductasa, DHPR: dihidropterina reductasa. Modificado de Arrieta B et al⁴

La PKU es considerada el error innato más frecuente dentro de las alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos⁵ (AA) (Tabla 1).

Grupo 1: Enfermedades por defecto en la síntesis o catabolismo de moléculas complejas:

Enfermedades lisosomales y peroxisomales:

- Mucopolisacaridosis
- Esfingolipidosis: Gaucher, Niemann-Pick, Gangliosidosis (Tay Sachs)

Enfermedades por alteraciones del transporte y procesamiento intracelular:

- Déficit de alfa-1 antitripsina
- Fibrosis quística
- Hemocromatosis

Grupo 2: Enfermedades por acúmulo de sustancias tóxicas

Aminoacidopatías:

- Fenilketonuria
- Tirosinemia
- Enfermedad de jarabe de arce
- Homocistinuria

Acidurias orgánicas

Trastornos del ciclo de la urea

Intolerancia a los azúcares:

- Galactosemia
- Fructosemia

Grupo 3: Enfermedades por déficit energético

Glucogenosis

Acidemias lácticas congénitas

Trastornos de la β -oxidación

Enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial

Tabla 1: Clasificación fisiopatológica de los errores innatos del metabolismo. *Modificado de Martín Sánchez et al⁶*

En la fenilketonuria se produce por tanto elevación de la Phe, la cual es un aminoácido aromático esencial que forma parte aproximadamente del 5% de las proteínas y es absorbido a nivel intestinal de forma competitiva con los otros aminoácidos neutros (alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, serina, treonina, glutamina, asparagina, tirosina, cisteína, triptófano, glicina, leucina). El 25-40% de la Phe procedente de la degradación de otras proteínas y de la dieta se emplea para la síntesis de proteínas endógenas y el 60-75% restante es hidroxilada a tirosina (Tyr). En

circunstancias especiales la Phe sufre procesos de decarboxilación y transaminación a feniletilamina y fenilpiruvato respectivamente⁷(Figura 2).

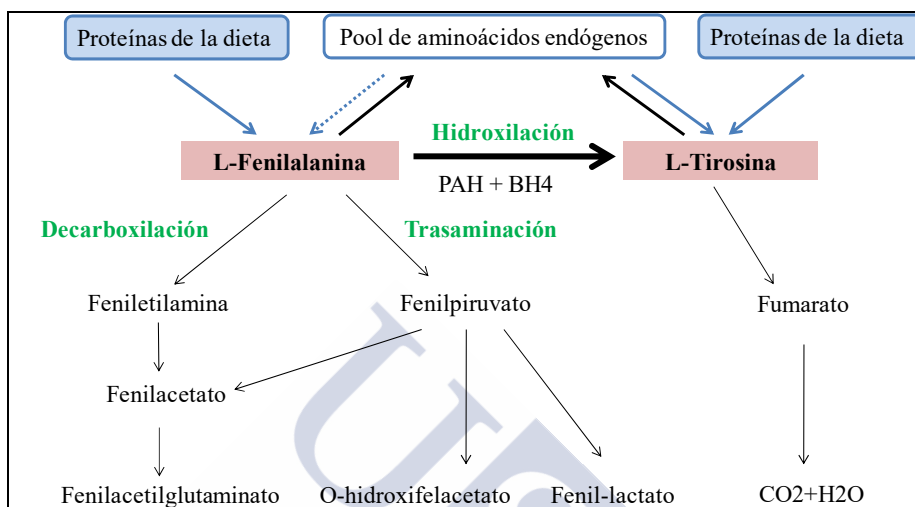


Figura 2: Metabolismo de fenilalanina en humanos. La ingesta de fenilalanina se realiza a través de la dieta y en situaciones especiales como por ejemplo aumento del catabolismo puede originarse de grupos de aminoácidos. La hidroxilación por parte de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) con su cofactor BH₄, en presencia de O₂ molecular, produce L-Tirosina. El metabolismo alternativo de la fenilalanina por decarboxilación o transaminación produce varios metabolitos que se excretan a través de la orina. Basado en Scriver CR y Kaufman S (2001) Fuente^{8, 9}

1.2 HISTORIA

La PKU fue identificada por primera vez por el médico noruego Ivar Asbjørn Følling en 1934 al detectar la enfermedad en dos niños con retraso psicomotor y retraso mental cuya madre refería que los niños presentaban un olor peculiar, similar a paja mojada o a ratón, en la orina y el sudor. El doctor Følling tras una larga investigación dedujo que el color verde intenso que se producía al poner en contacto la orina de estos pacientes con cloruro férrico y el olor que presentaban eran debido a la acumulación de ácido fenilpirúvico. En estudios posteriores en pacientes con retraso mental que estaban ingresados en instituciones especiales detectó que ocho de ellos pertenecientes a tres familias excretaban orina con el mismo olor y color al añadir cloruro férrico^{10, 11}.

En su primer trabajo¹² Følling sugería que se trataba de una enfermedad metabólica originada por un trastorno hereditario en el metabolismo de la fenilalanina que asociaba

retraso mental, dándole el nombre de “imbecillitas phenylpyruvica”. Posteriormente y durante algún tiempo la enfermedad llevó su nombre: *enfermedad de Fölling*. Un año después de esta publicación¹² (1935) Lionel Penrose confirmó que la enfermedad metabólica presentaba una herencia autosómica recesiva. No fue sino hasta 3 años después de la primera descripción de la enfermedad que Lionel Penrose y Juda Hirsch Quastel la bautizaron como fenilcetonuria, considerándolo un nombre más específico y con el que se la conoce actualmente^{13, 14}

Ivar Asbjørn Fölling

En 1947, el doctor George A. Jervis, observó que cuando se administraba una dosis de fenilalanina a individuos sanos se elevaba la tasa de formación de tirosina, otro aminoácido. Sin embargo cuando se suministraba la fenilalanina a individuos que padecían fenilcetonuria no presentaban tal elevación. Además estos pacientes presentaban un aumento de la excreción de ácido fenilpiruvico en orina, así como una elevada concentración de fenilalanina en los fluidos corporales. Los avances en el tratamiento no se iniciaron hasta 1953, año en que George Jervis demostró que el defecto enzimático de la enfermedad involucraba la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa que cataliza la reacción bioquímica que transforma la fenilalanina en tirosina¹⁴⁻¹⁶.



Ese mismo año el doctor alemán Horst Bickel determinó que el exceso de fenilalanina en la dieta era la causa de la conducta hiperactiva y descontrolada de los pacientes con la enfermedad. Decidió, a petición de la madre de una de sus pacientes de dos años de edad, crear una dieta baja en fenilalanina, lo que mejoró sustancialmente la calidad de vida de la niña¹⁷. A partir de las nuevas evidencias se publicaron varios trabajos en los que se demostraba la efectividad de las dietas bajas en fenilalanina, basadas en los hallazgos de Jervis. Estos eventos llevaron a la creación de los programas de exámenes a recién nacidos que hoy en día se siguen utilizando¹⁸.

A partir de entonces se fueron implantando los programas de detección precoz. En España el cribado neonatal se inició en 1968 para la fenilcetonuria, cuando el profesor Federico Mayor Zaragoza puso en marcha el primer programa de cribado neonatal

desde la Universidad de Granada. En 1975 el Comité de Cribado Neonatal de la OMS postula los principios que debe cumplir una enfermedad para que sea incluida dentro de los programas de cribado neonatal, que se basan en las recomendaciones de Wilson y Jungner¹⁹. De forma resumida, los criterios de Wilson y Jungner son los siguientes²⁰:

- La prevalencia de la enfermedad justifica el coste del cribado
- El trastorno no se identifica fácilmente a través de una exploración física
- La enfermedad causa graves complicaciones
- El diagnóstico y tratamiento precoz mejora el pronóstico de la enfermedad
- La prueba para la detección debe ser sensible específica y económica.

En 1978, el Ministerio de Sanidad establecía el Programa de Detección Precoz Neonatal de Fenilcetonuria e Hipotiroidismo Congénito, y a partir de 1979 se organizaría el Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad, integrado dentro del Real Patronato de Educación y Atención a Deficientes. Con su apoyo se crearían varios laboratorios, de modo que en 1980 existían ya 10 centros de cribado y la cobertura del programa a escala nacional era del 25% de los recién nacidos. En 2009 se cribaron 498.711 recién nacidos para fenilcetonuria e hipotiroidismo en España, cifra que correspondía a una cobertura de prácticamente el 100% de los recién nacidos según el Instituto Nacional de Estadística, continuando con esa cobertura en el momento actual. Galicia fue la primera comunidad autónoma y de las primeras de Europa en iniciar el cribado neonatal ampliado por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en junio de 2000, el cribado inicial fue en 1978 .

La aplicación del cribado poblacional permitió descubrir que las hiperfenilalaninemias no se debían todas a defectos en la actividad de la PAH, sino que podrían deberse a defectos en la síntesis o el reciclaje del cofactor BH4¹¹. Los primeros pacientes con HPA secundaria a alteraciones en el metabolismo de la BH4 fueron identificados en 1969 por Tada, en 2 hermanas con una forma nueva de HPA, confirmándose a posteriori un déficit en la DHPR²¹.

En 1983 los doctores Li Chen y Savio L.C. Woo, ambos del Departamento de Medicina Celular y Genética en la Escuela de Medicina Mount Sinai, aislaron e identificaron por

primera vez el gen que codifica la elaboración de la enzima fenilalanina hidroxilasa, cuya carencia es responsable de la enfermedad²².

En 1999 Kure *et al.*²³ describieron un grupo de pacientes con mutaciones en el gen *PAH* que presentaban buena respuesta al tratamiento con BH4, beneficiándose por tanto de un tratamiento diferente a la restricción dietética²⁴. Actualmente existen bases de datos donde se describen las mutaciones con mayor respuesta a BH4 como la base de datos BIODEF (<http://www.biopku.org/home/biodef.asp>) y la red iNTD (<http://www.intd-online.org>)^{25, 26}.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

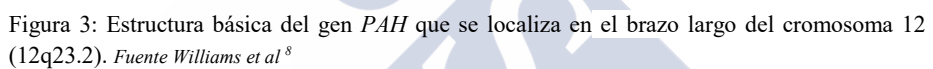
La PKU presenta una variación geográfica considerable. En Europa se estima una prevalencia de 1 cada 10.000 nacimientos, detectándose en Finlandia la prevalencia más baja de Europa de 1 caso cada 100.000 y la tasa más alta en Turquía de 1 de cada 4000 nacimientos, debido a la alta consanguinidad dentro de esta población, así como también se ha observado una elevada prevalencia en Irlanda del Norte^{5, 27}.

En EEUU se ha observado una prevalencia de 1 cada 15.000. En el caso de América Latina la prevalencia oscila entre 1 caso cada 25.000-50.000 nacimientos siendo mayor en el sur de América Latina.

En Asia la prevalencia varía desde 1 cada 15.000 a 1 cada 100.500 según las diferentes regiones de China, menos de 1 cada 200.000 en Tailandia y sobre 1 cada 70000 en Japón. La prevalencia en África sin embargo es muy baja.

En España la incidencia de fenilcetonuria es de 1/10.000 nacidos vivos²⁸, siendo la incidencia estimada de 1:19.747 para pacientes con PKU. En Galicia se describe una prevalencia de PKU de 1/12.363 y de 1/6005 de HPA benigna^{27, 29}.

	L2	
--	----	--



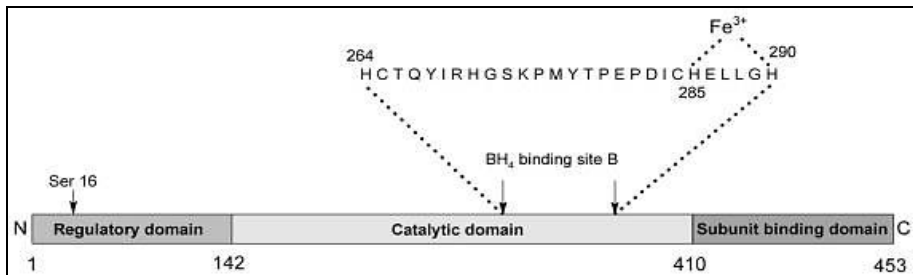


Figura 4: Componentes estructurales de PAH. El dominio catalítico de PAH contiene 26 o 27 aminoácidos responsables de la unión del hierro férrico y el cofactor (BH_4). Fuente Williams *et al*⁸

Dominio de regulación (residuos 1-142): La enzima está fuertemente regulada, actuando con activador alostérico los niveles de Phe y como inhibidor los niveles de BH4.

Dominio catalítico (residuos 143-410): es el centro activo de la enzima que contiene el Fe y tres moléculas de agua y el locus de unión para la BH4.

Dominio de tetramerización (residuos 411-452): para realizar su función las proteínas se ensamblan en forma de dímero y sobre todo de tetrámero, de esta forma su actividad es mucho mayor. Para la formación del tetrámero la PAH necesita de la BH4^{32, 33}(Fig. 5)

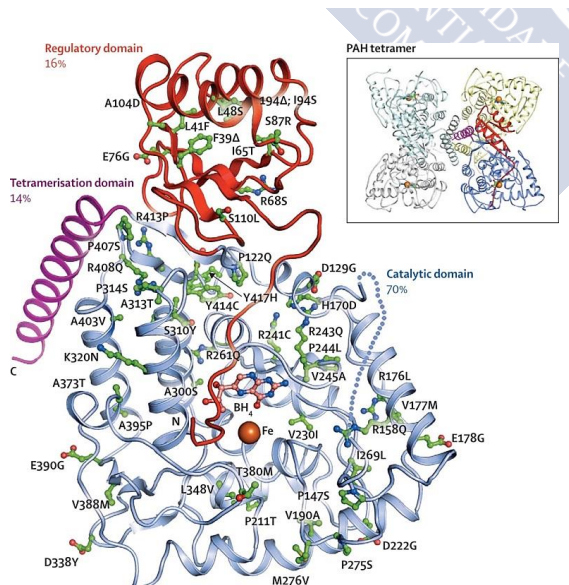


Figura 5: Estructura tridimensional de la PAH con las mutaciones más frecuentes respondedoras a BH4. Las variantes más frecuentes se localizan en el dominio catalítico (70%), seguido del dominio de regulación (16%) y del dominio de tetramerización (14%). Fuente Blau *et al.*⁵

La mayoría de las mutaciones que dan lugar a PKU se localizan en el dominio catalítico, sin embargo hay algunas mutaciones que pueden producirse en el interfaz de los dominios, afectando a la estabilidad de la enzima, lo que le confiere una menor solubilidad, menor estabilidad térmica y mayor predisposición a ser degradada por las enzimas proteolíticas^{5, 34}.

A parte de las mutaciones en el gen *PAH* responsable de defectos en la síntesis de la PAH, también se han descrito diversas mutaciones en las enzimas responsables de la síntesis y reciclado del cofactor BH₄, comportándose también de modo autosómico recesivo excepto las mutaciones que afectan al enzima guanósín trifosfato ciclohrolasa (GTPCH) que presenta una herencia autosómica dominante²⁸. Los genes y su locus se reflejan en la Tabla 2

Gen	Enzima afectada	Locus
<i>PAH</i>	Fenilalanina hidroxilasa	12q24.1
<i>DHPR</i>	Dihidropterina reductasa	4p15.31
<i>PCD</i>	Pterina 4αcarbinolamina dehidratasa	10q22
<i>GTPCH</i>	GTP-Ciclohrolasa I	14q22.1-q22.2
<i>PTS</i>	Piruvil Tetrahidropterina sintasa	11q22.3-q23.3
<i>DNAJC12</i>	HSP40 miembro C12	10q21.3

Tabla 2: Enzimas que se pueden ver alteradas ante un paciente con hiperfenilalaninemia, gen y locus correspondiente. Fuente García et al⁷

Recientemente se han descrito pacientes con hiperfenilalaninemia y frecuente afectación neurológica debido a variantes patógenas en el gen *DANJC12*^{2, 3}

Diversos estudios in vitro permiten, en muchos casos, correlacionar el defecto funcional de las mutaciones con el fenotipo de los pacientes^{35, 36}. Se ha objetivado correlación entre mutaciones en homocigosis con actividad residual in vitro que se asocian a PKU leves y mutaciones que dan lugar a actividad nula o muy reducida in vitro que originan

formas severas de la enfermedad. Sin embargo no siempre se asocia un determinado genotipo con un fenotipo. Hay que tener en cuenta también que los pacientes pueden ser heterocigotos para distintas mutaciones y el fenotipo resultante va a ser el resultado de la interacción de las proteínas originadas por distintos alelos.

No obstante, la clasificación de los genotipos de HPA puede permitir la predicción de los fenotipos bioquímicos y metabólicos permitiendo un mejor manejo de los recién nacidos con hiperfenilalaninemia^{37, 38} y al menos hasta cierto punto, aunque la capacidad de respuesta a BH4 puede predecirse o excluirse del genotipo del paciente³⁹ no siempre sucede así. De ahí la importancia de los avances en la tecnología de genotipado y la disponibilidad de bases de datos genotípicos y de locus que permitan ampliar nuestra comprensión de las correlaciones entre la variante genética individual, la actividad residual de la HPA, la capacidad de respuesta de la BH4 y el fenotipo clínico de PKU⁴⁰.

En estudios realizados en España se ha visto también una gran heterogeneidad genética en nuestra población, si bien se ha objetivado una buena correlación genotipo-fenotipo de los pacientes⁴¹.

En el caso de Galicia en un estudio que valoró 105 pacientes se identificó también una buena correlación genotipo-fenotipo, siendo las mutaciones más frecuentes (47.2%) de todos los alelos investigados (IVS10-11G> A, p.R261Q, p.V388M, p.R176L, p.E280K, p.A300S)⁴².

1.5 FISIOPATOLOGÍA:

La fenilalanina es hidroxilada a tirosina por la PAH, necesitando como sustrato la Phe, hierro, oxígeno y como cofactor la BH4.

La BH4 se sintetiza a partir de trifosfato de guanosina (GTP) por tres enzimas adicionales: guanosín trifosfato ciclohidrolasa I (GTPCH I: EC 3.5.4.15), 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (PTS o PTPS: EC 4.6.1.10) y sepiapterina reductasa (SR: EC: 1.1.1.53).

La síntesis de novo del cofactor no es suficiente para controlar la Phe hepática y la homeostasis de neurotransmisores cerebrales por lo que la BH4, que es oxidado a la forma 4α-hidroxi-BH4 en cada ciclo de hidroxilación, mediante la acción de dos enzimas DHPR y Pterin 4αcarbinolamina deshidratasa (PCD) es nuevamente reducida a tetrahidrobiopterina, manteniendo así los niveles de BH4 estables (Figura 6).

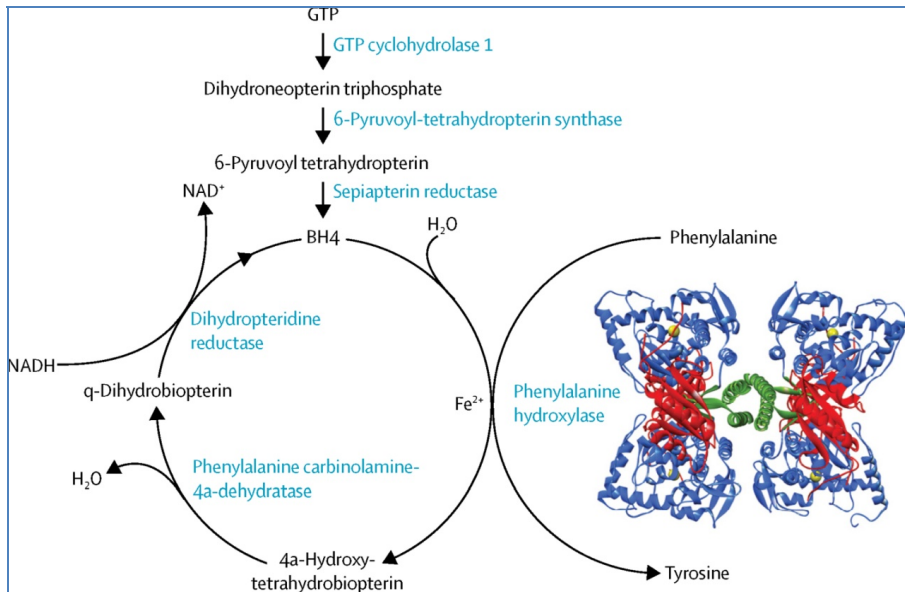


Figura 6: Sistema de hidroxilación de la Phe. BH4: sapropterina. GPT: trifosfato de guanosina. NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reductasa. NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido reductasa fosfato. Fuente: van Spronsen et al²⁷

La BH4 también actúa de cofactor de la TH y la TPH, por lo que interviene también en la síntesis de L-dopa, precursor de la dopamina y 5-hidroxitriptófano (5HT) precursor de la serotonina²⁸. Variantes en los genes que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de BH4 pueden dar lugar a un déficit de BH4 y como consiguiente también a déficit de los neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos. (Figura 7).

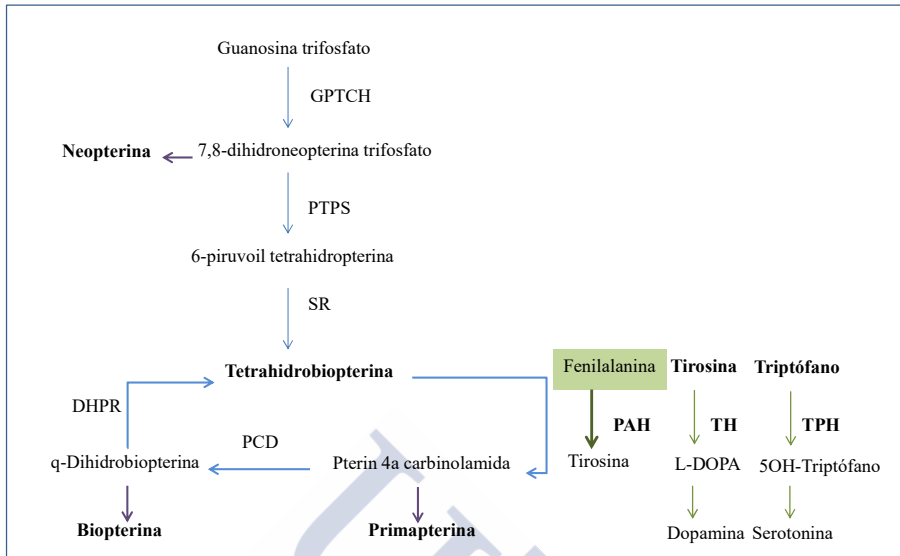


Figura 7: Síntesis y regeneración del cofactor BH4 y su implicación en la síntesis de catecolaminas. GTPCH: Guanosín trifosfato ciclohrolasa, PTPS: 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa, SR: sepiapterina reductasa. PCD: Pterina 4ocarbinolamina dehidratasa, DHPR: dihidropterina reductasa., PAH: fenilalanina hidroxilasa, TH: tirosina hidroxilasa, TPH: triptófano hidroxilasa. Fuente Belanger et al.²⁸

Como consecuencia de la alteración en alguna de las enzimas que participan en la hidroxilación de la fenilalanina se produce una concentración anómala de Phe, que se va a acumular en la sangre y tejidos, lo que dará lugar a una alteración del desarrollo y función cerebral.

Existen varias teorías que postulan cuál es el mecanismo por el que se produce el deterioro neurológico en los pacientes con PKU³⁹ (Figura 8).

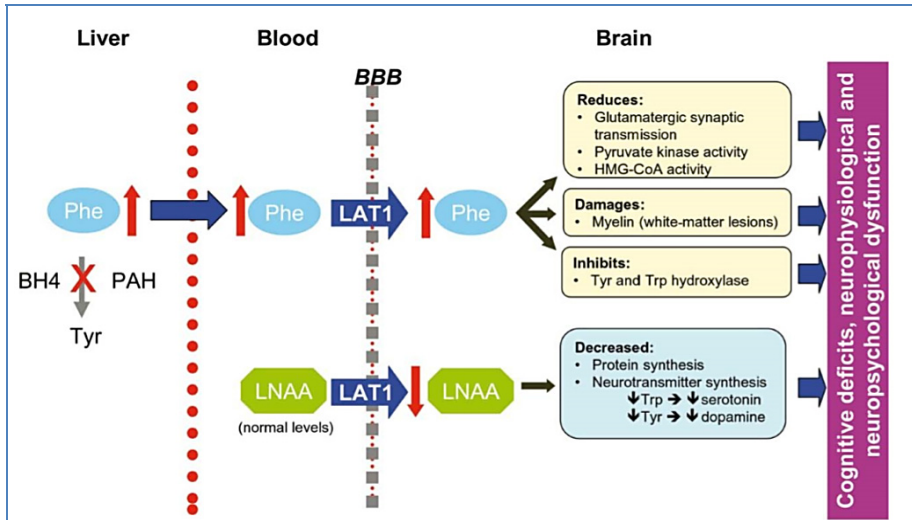


Figura 8: Fisiopatología de la PKU. Resumen de los principales mecanismos de deterioro neurocognitivo secundario a altas concentraciones de fenilalanina.

Phe: fenilalanina. BBB: Barrera hematoencefálica. LNAA: aminoácidos neutros. LAT1: L-transportador de aminoácidos tipo 1. BH4:tetrahidrobiopterina. HMG-CoA:3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A. Tyr: Tirosina. Trp:triptófano. Fuente van Spronsen et al²⁷

Por una parte existe la hipótesis de que la neurotoxicidad es debida a los metabolitos de la Phe (ácido fenilacético, fenilacético y fenilpirúvico). Y por otra, dado que la Phe comparte al transportador cerebral L-aminoácido transportador 1 (LAT1) con otros AA neutros y presenta una mayor afinidad por él, ante cifras elevadas de Phe se produce una disminución en el transporte de estos AA a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y por tanto una disminución de su biodisponibilidad. Esta disminución de la biodisponibilidad de los AA neutros va a originar un descenso de la síntesis de proteínas cerebrales y como consiguiente podría producirse un descenso de la plasticidad sináptica y del crecimiento axonal⁴³. Se han descrito lesiones a nivel de la sustancia blanca que se asociaron a una disminución en la formación de mielina, secundaria a la alteración en la síntesis de la proteína básica de la mielina.

Como consecuencia de una interferencia en el transporte a través de la barrera hematoencefálica de AA neutros como la tirosina y el triptófano, tanto por disminución del mismo como por inhibición competitiva de la hidroxilación de la tirosina y del triptófano que comparten una misma coenzima, la tetrahidrobiopterina, a nivel cerebral también se va producir una reducción de la síntesis de neurotransmisores.

Otra de las teorías es que el daño cerebral que se produce en los pacientes con PKU es debido al déficit de tirosina, que se convierte en un aminoácido esencial al estar disminuida su biosíntesis. Estas alteraciones debían estar subsanadas al estar suplementadas las dietas de estos pacientes con este aminoácido, sin embargo, los niveles de tirosina fluctúan a lo largo del día y es un aminoácido neutro que también compete con la Phe en el transporte a través de la barrera hematoencefálica¹¹.

Por otra parte las concentraciones elevadas de Phe se asocian a un descenso de la concentración sérica de colesterol por afectación de la vía de la síntesis de colesterol al disminuir la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA: EC 1.1.1.88), como consecuencia se produce una alteración en la producción y mantenimiento de la mielinización cerebral.

Otros posibles mecanismos de daño inducido por hiperfenilalaninemia a nivel cerebral incluyen una alteración de la glicolisis por reducción en la actividad de la piruvato quinasa, alteración en la transmisión glutamatérgica y efecto patógeno directo por competición con la glicina en los receptores de N-metil-D-aspartato⁵.

1.6 CLASIFICACIÓN

Existe un amplio espectro de fenotipos metabólicos debido a la posible combinación de un elevado número de mutaciones¹¹. Por tanto no hay un consenso respecto a cuál debe ser la mejor opción para clasificar la HPA. Se han establecido diferentes clasificaciones según el fenotipo, el nivel de Phe en sangre al diagnóstico, el grado de tolerancia de Phe y el curso clínico de la enfermedad⁴⁴.

Dependiendo del defecto enzimático, el genotipo y la severidad de la enfermedad se diferencian 4 fenotipos:

- PKU clásica
- PKU moderada
- PKU leve
- HPA leve o HPA no PKU

Adicionalmente tenemos la PKU sensible a BH4.

En el primer caso la actividad de la PAH es nula o muy escasa, en cambio en los tres últimos tipos existe una cierta actividad residual del enzima⁵.

Güttler en 1980 clasificó por primera vez el déficit de PAH en función de las cifras de Phe en sangre al diagnóstico (previo a iniciar cambios dietéticos) y la tolerancia de Phe a los 5 años¹⁴. Según los niveles de Phe en sangre se pudieron diferenciar entre 4 fenotipos diferentes de PKU^{37, 45}:

- PKU clásica: cuando los niveles de Phe pretratamiento son $> 1200 \mu\text{mol/L}$.
- PKU moderada: cuando los niveles de Phe de pretratamiento se encuentran entre $600\text{-}1200 \mu\text{mol/L}$.
- PKU leve: si los niveles se encontraban entre $360\text{-}600 \mu\text{mol/L}$.
- HPA leve (MHPA) si los niveles pretratamiento de Phe son entre $120\text{-}360 \mu\text{mol/L}$.

De forma más simplificada diferencian 3 fenotipos. Esta clasificación se sigue empleando en la actualidad^{28, 37, 45}:

- PKU clásica: cuando los niveles de Phe pretratamiento son $> 1200 \mu\text{mol/L}$.
- PKU leve-moderada: si los niveles se encontraban entre $360\text{-}1200 \mu\text{mol/L}$.
- HPA leve (MHPA) si los niveles pretratamiento de Phe son entre $120\text{-}360 \mu\text{mol/L}$.

La tolerancia a la Phe se ha establecido también como un parámetro para fenotipar de los diversos tipos de deficiencia de HAP. La tolerancia de Phe indica la ingesta diaria de Phe que un paciente puede tolerar sin que aumente la cifra de Phe en sangre por encima del rango superior que se considera como objetivo de tratamiento.

En general, la tolerancia de Phe se determina a la edad de 5 años.

Distinguimos 3 tipos según la tolerancia de Phe⁴⁵:

- PKU clásica con un tolerancia de Phe de 20 mg/ kg/día ($250\text{-}300 \text{ mg/día}$).

- PKU moderada cuando la tolerancia de Phe se encuentra entre 20-25 mg/kg/día (350-400 mg / día)
- PKU leve con una tolerancia de Phe de 25-50 mg/ kg/día (400-600 mg/día)
- MHPA si no precisan realizar dieta

En 2011 Blau notificó que la tolerancia a la Phe puede ser predecible ya a la edad de 2 años, y esa tolerancia a los 2, 3 y 5 años se correlaciona con la tolerancia a los 10 años. Por el contrario, en los adultos es necesario reevaluarla nuevamente⁴⁴.

En la actualidad estas clasificaciones no son exactas a la hora de diagnosticar a los pacientes, porque existe una gran variedad de puntos de corte y al realizarse la detección en el momento neonatal, los pacientes inician el tratamiento antes de alcanzar las concentraciones máximas de Phe. En cuanto a la tolerancia de Phe, es difícil de calcularla de forma exacta debido a las discrepancias que existen entre la ingesta prescrita de Phe y la ingesta real, por lo tanto, la clasificación según el grado de tolerancia que permitía diferenciar entre 4 fenotipos no es muy real³⁹.

Según el curso clínico de la enfermedad se pueden distinguir varios tipos de déficits de HPA. Los datos que se valoran son el resultado de, por ejemplo, educación, coeficiente intelectual, las concentraciones máximas de Phe en sangre (por ejemplo, durante infección febril, incumplimiento dietético), la fluctuación de los niveles de Phe en sangre y las relaciones Phe/Tyr. Aunque, en la práctica diaria, el curso clínico de la enfermedad solo se usa en 31% de los centros metabólicos para distinguir diferentes formas de PKU⁴⁴.

En la última guía Europea³⁹ para el diagnóstico y tratamiento de la hiperfenilalaninemia se sugiere emplear la siguiente clasificación simplificada, derivada de Blau^{5, 39}:

- No requieren tratamiento.
- Requieren dieta, BH4 o ambas.

En esta trabajo hemos empleado las clasificaciones previas que siguen vigentes.

1.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El fenotipo clínico se correlaciona directamente con los niveles de Phe en sangre, reflejando indirectamente el grado de déficit de PAH.

El daño producido por el aumento de Phe en sangre no se manifiesta de forma aguda. Los pacientes con fenilcetonuria clásica no tratada durante los primeros 6 meses son niños asintomáticos, posteriormente la clínica fundamental es el retraso psicomotor que se van intensificando con afectación del desarrollo intelectual y retraso mental de mayor a menor severidad. A partir de los 2-3 años el retraso mental ya es moderado o grave, pudiendo presentar un retraso psicomotor, trastorno generalizado del desarrollo con o sin convulsiones (epilepsia generalizada, síndrome de West), hiperactividad muy marcada, impulsividad y conducta psicótica con agresividad, ataques incontrolados de rabia o excitación, tendencias destructivas y automutilaciones e incluso autismo.

En los adultos es frecuente que presenten demencia, problemas de carácter y personalidad, esquizofrenia y epilepsia de difícil control. Se añade a todo ello, signos piramidales, temblor e incluso parkinsonismo y deterioro global¹¹.

La piel, el cabello y los ojos van a presentar un color claro debido a la disminución de la síntesis de melanina, la orina y sudor pueden tener un “olor a ratón” por la presencia de fenilacético y a nivel de la piel presentan unas lesiones similares a un eczema⁴⁶.

Existen casos de diagnóstico tardío que muestran una evolución atípica, sin afectación cognitiva o leve disminución de la capacidad intelectual. En estos casos se cree que a pesar de tener unos niveles de Phe en sangre elevados no se corresponden con niveles elevados a nivel cerebral¹¹.

Los pacientes con PKU que reciben tratamiento de forma precoz presentan una buena evolución clínica, con coeficiente intelectual dentro de la normal, sin embargo se ha visto que es algo inferior a un grupo control, presentando dificultades en el aprendizaje, torpeza motriz, dificultades visoespaciales y visuoestructurales, hiperactividad, trastornos psicológicos y trastornos del sueño^{47, 48}. En los pacientes mayores, es más frecuente encontrar problemas en relación con el estado de ánimo (ansiedad y

depresión), bien por alteración neurobiológica (síntesis de serotonina) así como alteraciones en la calidad de vida secundario a padecer un trastorno crónico.

Aquellos pacientes con CPKU que una vez diagnosticados y tratados no siguen una dieta estricta y presentan niveles elevados de Phe en sangre, progresivamente van a manifestar sintomatología neurológica en forma de hiperactividad, labilidad emocional, dificultades en la concentración, trastornos del comportamiento y del sueño y finalmente deterioro neurológico.

Los pacientes con MHPA están asintomáticos, aunque actualmente se están describiendo una incidencia mayor con respecto a la población general de problemas de sueño, atención, cociente intelectual algo inferior e incluso alteraciones en el EEG sin llegar a presentar manifestaciones clínicas⁴⁹.

Los fetos de madres de pacientes con hiperfenilalaninemia presentan aproximadamente el doble de niveles que la madre y la actividad de PAH no inicia su actividad hasta las 28 semanas de edad gestacional, por lo que según los niveles de Phe de la madre estos niños pueden llegar a presentar un retraso mental grave, retraso del crecimiento intrauterino, microcefalia, dismorfias faciales similares al síndrome feto-alcohol (filtrum largo, labio superior fino, puente nasal ancho, paladar hendido, hipoplasia del maxilar, micrognatia, orejas de implantación baja, pabellones auriculares poco desarrollados o grandes), atresia de esófago y malformaciones renales y cardíacas¹¹. Los efectos teratógenos no se presentan si la madre presenta un adecuado control de los niveles de Phe¹¹.

En el caso de que la causa de la HPA sea debida a un trastorno en el metabolismo de la BH4, los pacientes a pesar de realizar un adecuado tratamiento dietético, presentan un deterioro neurológico por déficit en los neurotransmisores y déficit de tetrahidrofolatos, cuadro conocido antiguamente como Hiperfenilalaninemia Maligna. Van a presentar una afectación neurológica más severa que los pacientes con PKU, consistente en distonía, alteraciones en la motilidad ocular (estrabismo alternante, opsoclonus), alteraciones en la regulación de la temperatura e hipoglucemias en el período neonatal, trastornos del sueño, irritabilidad, hipotonía central con hipertonía periférica, encefalopatía grave progresiva y microcefalia^{28, 50}.

1.8 DIAGNÓSTICO

1.8.1 Cribado neonatal

El cribado de hiperfenilalaninemia se recomienda realizar a todo recién nacido dentro de los primeros días de vida mediante la obtención de una muestra de que se recoge en un papel de filtro absorbente denominado genéricamente tarjeta de Guthrie, que cumpla con las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2014/07 de Munktel).

Para la obtención de la muestra de sangre se realiza la punción por norma general en la parte medial o lateral de la superficie plantar del pie de los recién nacidos²⁴ (Figura 9), aunque recientemente se ha publicado la posibilidad de obtener la muestra de sangre mediante la punción venosa a nivel del dorso de la mano⁵¹. Las manchas de sangre que se obtienen deben contener al menos 75 μL (aproximadamente 13 mm de diámetro) y se deben dejar secar a temperatura ambiente sin contacto con la luz solar directa.

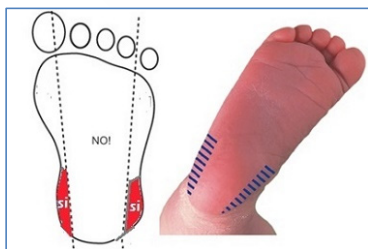


Figura 9: Zonas de punción donde es aconsejable realizar la toma de muestra de sangre para realizar las pruebas metabólicas.

Inicialmente se utilizaba el método de Guthrie, posteriormente fue modificándose, empleando métodos cromatográficos, fluorométricos, de inmunoensayo, espectrofotométricos y actualmente se utiliza la MS/MS¹¹. La espectrometría de masas en tándem se desarrolló como un método rápido para lograr una cuantificación fiable de las concentraciones de AA con pequeña cantidad de sangre o plasma. Este método produce una menor tasa de falsos positivos, puesto que mide niveles de Phe y Tyr y proporciona la relación Phe/Tyr⁴⁴.

Con la técnica de MS/MS es suficiente que el neonato haya recibido alimentación 24 horas para realizarle el cribado y que éste sea válido, por ello se aconseja en general realizarlo a las 48. Se debe interpretar con precaución el resultado en aquellos pacientes

que reciben nutrición parenteral, transfusión sanguínea o son prematuros⁴⁴. Existen una serie de situaciones en las que se aconseja repetir la toma de muestra y son las siguientes:

- En los prematuros de menos de 34 semanas y/o 2.000 g de peso y gemelos monocigóticos se aconseja realizar una segunda determinación entre la segunda y cuarta semana de vida.
- Patología muy grave al nacimiento: realizar una muestra al ingreso y repetirla a las 48-72 horas de vida.
- Nutrición parenteral: se debe repetir la muestra cuando lleven 48-72 horas con nutrición enteral.
- Transfusiones sanguíneas: en este caso se debe realizar una toma de muestra a las 48-72 horas de la transfusión y repetirla a los 120 días.

1.8.2 Confirmación diagnóstica

En aquellos neonatos que se identifique una cifra de Phe >120 $\mu\text{mol/L}$ por MS/MS con un cociente Phe/Tyr > 2 , es recomendable que sean remitidos a un centro de referencia en Enfermedades Metabólicas Hereditarias (EMH) para confirmar el diagnóstico e iniciar tratamiento si precisa.

Se debe recoger una muestra de plasma que permita confirmar los niveles elevados de Phe lo más pronto posible para iniciar el tratamiento si precisa en los primeros 10 días de vida. En el caso en el que el neonato presente hiperfenilalaninemia, el análisis de aminoácidos sanguíneos revelarán concentraciones crecientes de Phe (> 120 $\mu\text{mol/L}$ o 2 mg/dL), concentraciones de Tyr normales o reducidas (relación de Phe/Tyr >2) y concentraciones normales de los aminoácidos restantes. Esto permite realizar un diagnóstico diferencial con otras causas de HPA como la enfermedad hepática, enfermedades genéticas (tirosinemias, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa), o adquiridas (hiperfenilalaninemia transitoria del prematuro, insuficiencia hepática o renal)^{11, 44}.

Se valorará asimismo si la causa de HPA puede deberse a un defecto en la síntesis o reciclaje de BH4 y valorar si se puede beneficiar del tratamiento con el cofactor o es

necesario iniciar restricción dietética. Las alteraciones en el metabolismo de la BH4 son más severas que las PKU secundarias a déficit enzimático y no responden adecuadamente a la restricción dietética, por lo que requieren una terapia diferente.

Para el estudio de alteraciones en el metabolismo del BH4 es necesario:

- La determinación de la actividad de DHPR en una muestra de sangre en papel de filtro.
- Cuantificación de aminoácidos, ácidos orgánicos y pterinas en una muestra de orina de al menos 6 horas protegida de la luz y congelada inmediatamente.

La determinación de neopterina y biopterina nos permiten identificar el defecto enzimático que se encuentra alterado. Si nos encontramos con neopterina y biopterina disminuidas o nulas estamos ante un déficit de GTPCH. Si la que está disminuida es la biopterina pero la neopterina está muy elevada el defecto se encuentra en este caso en la PTPS. Si además lo que se detecta es primapterina (7-biopterina) estaríamos ante un déficit de PCD.

En los casos que exista sospecha de un déficit de BH4 se debe obtener también una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) para determinación de pterinas y neurotransmisores dopa y serotoninérgicos, que proporcionan información diagnóstica en cuanto a la severidad del déficit de BH4 (Tabla 3)²⁸.

En las deficiencias de SR y GTPCH la hiperfenilalaninemia puede no producirse o ser transitoria²⁸.

Deficiencia	Neopterina	Biopterina	Primaterina	Actividad DHPR	Phe
PKU	n-↑	n-↑	n	n	↑
GTPCH	↓	↓	n	n	↑*
PTPS	↑	↓	n	n	↑
PCD	↑	↓-n	↑	n	↑
DHPR	n	n-↑*	n	↓	↑

Tabla 3: Diagnóstico diferencial en HPA. n:normal, ↑: aumentado. ↓: disminuido *puede ser normal en período neonatal. PKU: Fenilcetonuria. GTPCH: Guanosín trifosfato ciclohidrolasa, PTPS: 6-piruvil tetrahidropterina sintasa, PCD: Pterina-4acarbonilamina dehidratasa, DHPR: dihidropteridina reductasa. *Fuente Blau et al⁴⁴*

En la PKU por déficit enzimático, especialmente en los casos de PKU leve y moderada pueden responder a BH4 por lo cual ya en el período neonatal se puede hacer un test de sobrecarga de BH4 durante 24 horas. Esta prueba se utilizó inicialmente para diferenciar a aquellos pacientes que presentaban niveles elevados de Phe secundarios al déficit de PAH y a pacientes con hiperfenilalaninemia debido a la deficiencia de BH4 (defectos enzimáticos en la biosíntesis o regeneración del cofactor BH4), además actualmente también permite detectar a aquellos pacientes con PKU que se pueden beneficiar de la administración de BH4 (Figura 10).

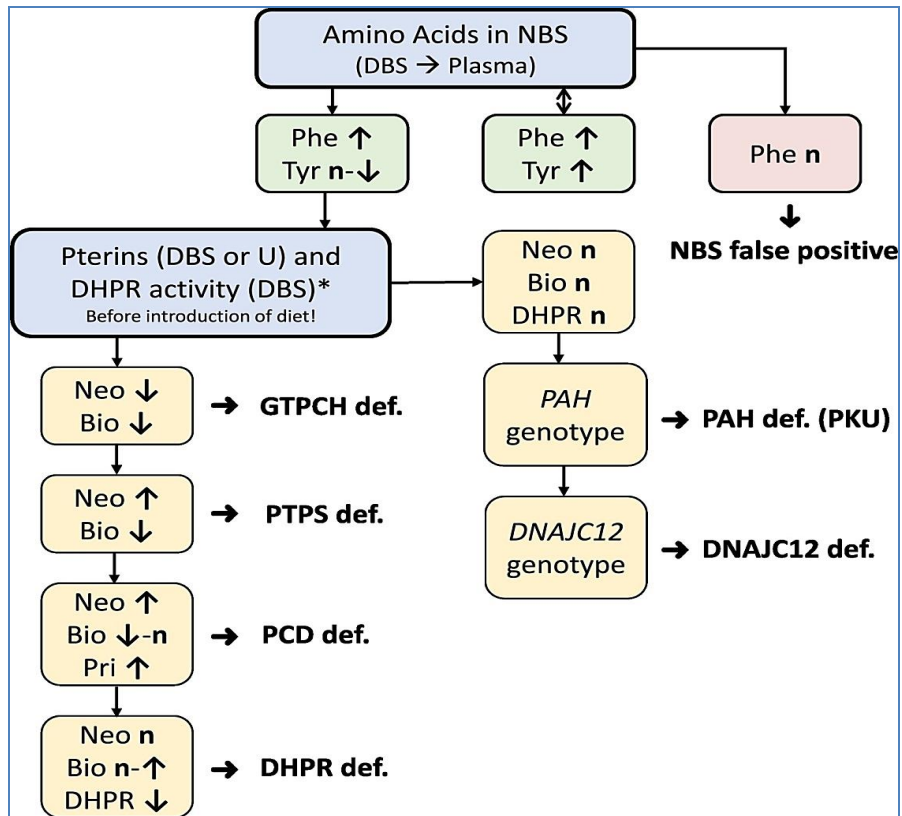


Figura10: Diagrama de flujo para el diagnóstico de HPA detectada en el cribado neonatal (NBS). DBS: muestra de sangre seca; U:orina; Phe :fenilalanina; Tyr: tirosina; Neo: neopterin; Bio: biopterina; Pri:primapterina (7-biopterina); DHPR: dihidropteridina reductasa; GTPCH: Guanosin trifosfato ciclohidrolasa I; PTPS: 6-piruvil-tetrahidropterin sintasa; PCD: pterin-4a-carbinolamina deshidratasa; PAH: fenilalanina hidroxilasa; PKU: fenilcetonuria; n: normal; def: deficiencia.*Las pruebas de Pterinas y DHPR deben realizarse inmediatamente después de un NBS positivo, independientemente de la gravedad de la HPA. Fuente Blau et al²

1.8.2.1 Test de sobrecarga de BH4²⁸

Consiste en administrar 20 mg/kg de peso de BH4 sintética (dihidrocloruro de sapropterina) por vía oral y determinar los niveles de Phe basal y cada 4 horas, manteniendo una ingesta normal de proteínas, para observar si se produce una disminución de la cifra de Phe tras la ingesta de BH4.

En cualquier paciente sin 2 mutaciones nulas o 2 mutaciones responsivas: debe realizarse un test de sobrecarga de BH4 de 48 horas dando 20mg/kg a las 0 y 24 horas y analizando las concentraciones de Phe en sangre periférica a las 0,4,8,12,24,32,48 horas.

En el periodo neonatal: Test de sobrecarga de 24 horas (o de 8 horas aunque menos utilizado). Muestras de sangre y orina previo al inicio de la sobrecarga de BH4

Hablamos de:

✓ *Potencialmente responsivo a BH4* si se produce más del 30% de reducción de los niveles de fenilalanina

- Respondedor rápido si es en las primeras 24 horas
- Lento en las segundas 24 horas.

Un test (+) neonatal es predictivo de la respuesta de BH4.

Un test (-) neonatal no descarta la capacidad de respuesta a largo plazo

✓ *Respondedor a BH4* si hay un aumento del 100% o más de proteína natural y/o mejoría del control bioquímico (>75% de los niveles objetivo de Phe) y probado en un ensayo de hasta 6 meses de tratamiento^{27, 52}.

Si el nivel de Phe antes de realizar el test es <360 µmol/L porque ya presentan una dieta restringida en Phe, previo a iniciar el test de sobrecarga de BH4 se debe administrar una dosis de Phe oral de 100 mg/kg.

En el caso en el que el test se realice durante el periodo neonatal si la reducción de la cifra de Phe es 30% y sobre todo entre 20-30% se debe valorar repetir a los 6 meses, según las mutaciones que presente el individuo.

1.8.2.2 Estudio genético

La confirmación diagnóstica del defecto enzimático de la PAH sólo es posible mediante biopsia hepática por lo que actualmente se realiza la confirmación mediante el estudio de las mutaciones en el gen que codifica dicho enzima. Incluso en algunos casos permite predecir la actividad enzimática y/o la posible respuesta al tratamiento con BH4.

En aquellos pacientes sobre todo con MHPA en las que se ha excluido déficit de PAH y BH4 desde el punto de vista bioquímico y genético debe valorarse las mutaciones en *DNAJC12*. Además, debido a que algunos pacientes con deficiencia de *DNAJC12*

pueden presentar niveles normales o limítrofes de Phe en la sangre y no ser detectados en el cribado neonatal, en aquellos individuos que presenten retraso en el desarrollo, trastornos del movimiento, hiperactividad o autismo sería recomendable realizar un análisis de AA en sangre².

1.9 TRATAMIENTO

1.9.1 Consideraciones generales:

El principal objetivo de tratamiento en los pacientes con PKU es normalizar las concentraciones de Phe y Tyr en sangre y de esta forma prevenir el desarrollo de las alteraciones neuropsicológicas atribuidas a esta entidad⁵³. (Figura 12).

Ha habido muchos avances con respecto a las posibilidades de tratamiento en los pacientes con HPA, sin embargo la principal opción de tratamiento sigue siendo iniciar lo más precoz posible la restricción dietética de Phe. Ya en los años 90 Smith⁵⁴ hacía referencia a que un retraso en el inicio del tratamiento a las 4 semanas conducía a una disminución del coeficiente intelectual de 4 puntos. Por tanto debe iniciarse lo más precoz posible para prevenir el daño neurológico, siendo ideal antes de los 10 días de vida³⁹.

1.9.2 Tratamiento dietético:

El tratamiento dietético consiste en una dieta restringida en proteínas naturales, según la tolerancia individual de cada individuo, asociando una fórmula especial que contiene AA excepto Phe y suplementada con vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales.

Se entiende como tolerancia de fenilalanina a la cantidad de Phe (mg/kg por día o mg por día) que mantiene las concentraciones plasmáticas de Phe dentro del rango considerado objetivo de tratamiento.

El tratamiento dietético debe por tanto aportar una restricción de proteínas naturales pero que permita un aporte de Phe suficiente para mantener la síntesis proteica, dado que la Phe es un aminoácido esencial. Así, están descritos síntomas referidos a un déficit de Phe como anorexia, alopecia, rash perineal, alteraciones en el crecimiento en niños preescolares e incluso la muerte y también alteraciones bioquímicas como la aminoaciduria ³⁹.

Los pacientes deben restringir aquellos alimentos que contengan proteínas de alto y medio valor biológico (carnes, pescados, derivados lácteos, huevos, cereales, legumbres y frutos secos) que contienen alrededor de 50 mg de Phe por cada gramo de proteína. En el caso de los alimentos con proteínas naturales de bajo valor biológico (frutas y verduras) debido a su bajo contenido en Phe y su menor tasa de absorción no es en general necesario restringirlos de la dieta, excepto un control de aquellas que tienen mayor cantidad de proteína, siendo además una excelente fuente de calorías y oligoelementos^{5, 28}.

El segundo pilar del tratamiento dietético es la suplementación con sustitutos proteicos (mezcla de AA que no contienen o tienen muy poca cantidad de Phe) (L-AA) repartidos en al menos 3 veces al día⁵⁵.

El número de sustitutos proteicos disponibles aumenta constantemente⁵⁶, siendo la ausencia de Phe la única constante, con variabilidad en la presencia, ausencia o cantidad de lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas⁵⁷.

En los estudios publicados, se ha demostrado que el crecimiento de los pacientes con PKU es adecuada cuando la ingesta de proteínas (en gran medida administrada como suplementos de aminoácidos libres de Phe) cumple o supera las recomendaciones de la población general según la FAO/OMS/ONU de 2007. En general en muchos centros de Europa siguen las siguientes recomendaciones: L-AA / proteína total entre 2 y 3 g/kg/día en niños de 0-1 año; de 1 a 10 años; 1,5- g/kg/día y >10 años: 1 g/kg/día, no debiendo superar el 20% de las Kcal de la dieta^{39, 58}. En España es similar, y así Belanger refleja que se recomienda aquella cantidad, que teniendo en cuenta la

tolerancia de proteínas naturales, permita alcanzar un aporte proteico y calórico adecuada para su edad (según los criterios de la ESPGHAN en niños y los de la ASPEN y ESPEN en adultos)²⁸. Las fórmulas de AA exentas de Phe son preparados generalmente enriquecidos con hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas, cuyo porcentaje de suplementación varían de unas fórmulas a otras⁵⁹, aunque las últimas guías recomiendan que se deben encontrar dentro de los valores de referencia de la población normal.

Estos pacientes a tratamiento dietético no precisan restricción en cuanto a grasas e hidratos de carbono. Se recomienda mantener una ingesta de energía, macronutrientes y micronutrientes similar al promedio recomendado en la población sana³⁹.

1.9.2.1 Objetivos del tratamiento.

El objetivo del tratamiento nutricional para las personas con fenilcetonuria es mantener las concentraciones plasmáticas de Phe que apoyen el crecimiento óptimo, el desarrollo y el funcionamiento mental, mientras que proporcionan una dieta nutricionalmente completa.

El mejor parámetro para valorar el control de los pacientes con PKU es la Phe en sangre.

1.9.2.2 Indicaciones de Tratamiento:

En los pacientes con unos niveles de Phe en sangre $<360 \mu\text{mol/L}$, previos a iniciar restricción dietética, no se indica tratamiento dietético. En un estudio realizado por Gassio *et al.* se concluyó que los pacientes con estas cifras de Phe en sangre sin tratamiento presentaban un desarrollo neuropsicológico similar a los controles⁶⁰.

Dado que los niveles de Phe varían con el tiempo los pacientes con Phe $<360 \mu\text{mol/L}$ y $>120 \mu\text{mol/L}$ deben ser monitorizados de forma estrecha en los niños hasta la pubertad y en las niñas hasta la edad adulta, para control de su embarazo

Los pacientes que presentan niveles de Phe en sangre ≥ 360 $\mu\text{mol/L}$ deben recibir tratamiento dietético. Las Guías Europeas³⁹ recomiendan que estos pacientes reciban tratamiento al menos los primeros 12 años de vida si mantienen los niveles entre 360-600 $\mu\text{mol/L}$, para evitar el deterioro cognitivo que se produce en pacientes con fenilketonuria, debido a un mal control metabólico. Los pacientes con cifras de Phe en sangre > 600 $\mu\text{mol/L}$ deben recibir tratamiento de por vida.

En el caso de las mujeres en edad fértil, donde es esencial un buen control tanto a nivel pre-concepcional como durante el embarazo, deben mantener los niveles < 360 $\mu\text{mol/L}$ ³⁹.

A pesar de los buenos resultados que se obtienen con el tratamiento dietético, una dieta restringida en Phe y suplementada con una fórmula con mala palatabilidad tiene una serie de inconvenientes: precisa un régimen estricto, riesgo de defectos nutricionales, limitaciones sociales, dificultad de aceptación especialmente en la adolescencia y edad adulta.

1.9.3 Otras opciones de tratamiento:

Tratamiento con BH4 (clorhidrato de sapropterina): es el primer fármaco que fue aprobado como tratamiento para la PKU. Se trata de una versión sintética del cofactor BH4 de origen natural. Está indicado en aquellos pacientes cuyas mutaciones dan lugar a un fenotipo de PKU sensible a BH4, en los que al administrar una dosis de BH4 exógena produzca un aumento de la actividad de la PAH que permita disminuir los niveles de Phe en sangre.

Aprobada en el 2007 por la Food and Drug Administration (FDA) y en el 2008 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en pacientes con PKU mayores de 4 años sin alteraciones en el metabolismo de BH4 y en el 2015 la EMA lo aprobó para todas las edades^{61, 62}.

Los pacientes con PKU que responden a tratamiento con sapropterina en su mayoría son pacientes con PKU leve o moderada, siendo sólo en un pequeño porcentaje pacientes con PKU severa. Se cree que aquellos pacientes con mutaciones en el gen *PAH* que da

lugar a una PAH con actividad residual son los que más probabilidad tienen de responder.

La sapropterina se ha visto que aumenta la tolerancia a la Phe permitiendo realizar una dieta menos estricta, en ocasiones sin llegar a precisar una suplementación con una fórmula especial e incluso se ha demostrado la normalización de los oligoelementos, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados ⁶³. Sin embargo, se debe hacer un adecuado seguimiento de estos pacientes que permita identificar posibles déficits de nutrientes y ajustar la dosis necesaria de BH4 que asegure una nutrición y un desarrollo óptimo ⁶⁴.

La dosis varía desde 5 a 20 mg/kg/día sin presentar reacciones adversas importantes ⁶⁵. Los efectos secundarios del tratamiento, si los produce, son leves e incluyen clínica gastrointestinal (vómitos en el 13% y diarrea en el 10%), dolor faringolaríngeo (15%), rinofaringitis (14%) y cefalea (20%) ^{5,66}.

1.9.4 Otras posibilidades de tratamiento

Glicomacropéptido (GMP)

Esta proteína es un glicofosfopéptido de 64 AA que se origina del suero de queso, cuando la quimosina degrada la κ -caseína bovina, formándose para- κ -caseína que permanece en la cuajada, y glicomacropéptido, que constituye el 15-20% de las proteínas del suero. La forma comercializada de esta proteína contiene AA esenciales como la isoleucina, treonina y valina, con cantidades residuales de Tyr, triptófano y Phe indispensables en pacientes con PKU ¹¹. La cantidad de Phe que contiene puede variar desde 2-5 mg de Phe/g ⁶⁷. Hay datos que apoyan un mejor manejo nutricional de la PKU usando una dieta que contiene GMP, en comparación con las fórmulas de AA convencionales, mejorando la palatibilidad y la sensación de saciedad ⁶⁷⁻⁷⁰. El GMP, cuando se complementa con AA limitantes, podría por tanto, ser una terapia segura y alternativa a los aminoácidos sintéticos como la principal fuente de proteína en el manejo nutricional de PKU ⁷¹⁻⁷⁴, sin embargo, no hay datos concluyentes sobre los efectos del GMP en niños para defender su uso como alternativa segura al tratamiento nutricional ⁷⁵.

Suplementación de aminoácidos neutros de gran tamaño (LNAA)

Consiste en suplementar con aminoácidos neutros (tirosina, triptófano, treonina, isoleucina, leucina valina, metionina e histamina), produciéndose un efecto competitivo con la Phe dado que comparten el mismo transportador a nivel de la barrera hematoencefálica (LAT1), por consiguiente, se produciría un aumento del paso de los aminoácidos esenciales a nivel cerebral en detrimento de la Phe⁷⁶⁻⁷⁸. Esto conlleva a aumento de la concentración de tirosina y triptófano en el SNC y mejoría en la síntesis de las proteínas a nivel del SNC al restablecer el equilibrio de los aminoácidos cerebrales.

Uno de los inconvenientes de este tratamiento es que se pierde el control metabólico empleando como herramienta el nivel de Phe en sangre. Además habría que realizar una supervisión dietética para comprobar una adecuada ingesta de proteínas de alto valor biológico⁶². Por tanto, quedaría relegada para pacientes adultos que no presenten un adecuado cumplimiento dietético y no tienen un buen control metabólico. No estaría indicado para niños ni para embarazadas debido a que el efecto de la Phe elevada en sangre no es bien conocido. Actualmente aun no está aprobados en España.

Terapia enzimática

La terapia enzimática es otro enfoque terapéutico independientemente del genotipo de la enfermedad. Podría emplearse en individuos no respondedores al BH4 dado que no precisaría que hubiese una actividad enzimática residual.

Puede realizarse mediante la sustitución de la enzima mutada por un enzima recombinante como la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), con capacidad para metabolizar la Phe (Figura 11). La PAL es una enzima recombinante de origen vegetal, que transforma la Phe en compuestos no tóxicos como el ácido transcinámico y trazas de amonio, no produce Tyr ni precisa una cofactor. El ácido transcinámico se convierte en ácido benzoico, éste se conjuga con glicina para formar ácido hipúrico y es eliminado por vía renal, las pequeñas cantidades de amonio son fácilmente convertidas en urea.

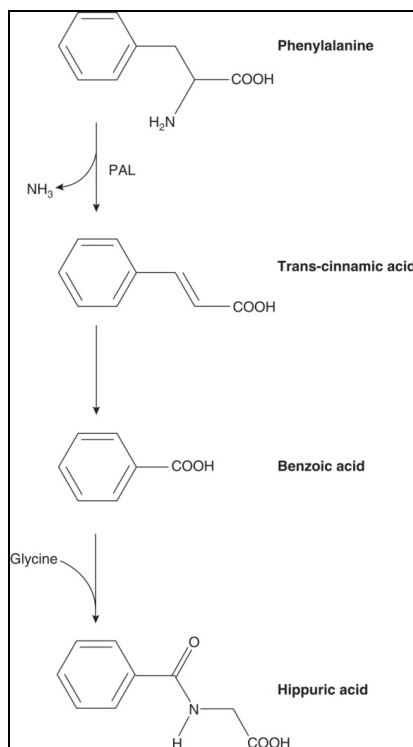


Figura 11: Degradación de la Phe con la participación de la PAL (fenilalanina amonio liasa).
Fuente Blau N et al⁷⁹

Se ha probado en un modelo de ratón PKU el uso de PAL recombinante donde su administración oral o subcutánea reduce las cifras de Phe. Estudios posteriores en modelos animales condujeron al desarrollo de una *Anabaena variabilis* PAL recombinante (genéticamente modificada para mejorar la resistencia a la proteasa) producida en *Escherichia coli* y conjugada con PEG para reducir la inmunogenicidad (rAvPAL-PEG). Los ensayos clínicos con pacientes PKU son prometedores, actualmente ensayos en fase I y II que usan PAL recombinante inyectable conjugado con PEG⁷⁹, han mostrado una reducción en los niveles de Phe.^{11, 80-82}. Se han iniciado ensayos fase III para evaluar la eficacia y la seguridad de las inyecciones autoadministradas.

Otra posibilidad es restablecer la actividad de la PAH en el hígado mediante el empleo de unas proteínas de fusión basadas en la PAH administradas por ejemplo con restos del

péptido de transcripción del VIH y fragmentos del factor de crecimiento del hepatocito humano con el objetivo específico de dirigir la PAH al hígado y restablecer la actividad de HAP en el hígado de pacientes con PKU. Se demostró que los niveles plasmáticos de fenilalanina se redujeron drásticamente en ratones tratados con proteínas de fusión basadas en la PAH después de la administración intravenosa⁸³.

Sin embargo, la terapia de sustitución con PAL parece ser un enfoque más prometedor. Además de la sustitución para complementar una deficiencia de PAH, esta terapia también convierte el exceso de Phe en productos fácilmente excretados y menos tóxicos como hemos comentado previamente⁸⁰.

Tratamiento con chaperonas

Las chaperonas son compuestos de bajo peso molecular que modifican la forma tridimensional de la PAH, estabilizando selectivamente el estado nativo de la proteína, lo que les permite pasar a través del sistema de control de calidad celular y ser correctamente enrutadas². Aun no se han conseguido resultados satisfactorios en este campo, además depende de la cantidad de enzima residual que presente el paciente²⁸.

Terapia génica y celular

La terapia génica consiste en la integración del gen *PAH* en células somáticas de los pacientes con fenilketonuria (hepáticas y musculares) mediante el empleo de vectores víricos modificados. Se han realizado numerosas investigaciones en los últimos años. Se demostraron importantes progresos que están en investigación en terapia génica empleando como vector el adenovirus en modelos ratones-PKU, mejorando los niveles de Phe en sangre⁸⁴⁻⁸⁷.

Trasplante hepático: se ha visto que en pacientes PKU trasplantados con un hígado no PKU fue efectivo, sin embargo la agresividad de la técnica y la necesidad de tratamiento inmunosupresor de por vida en comparación con el tratamiento dietético, no justifica su indicación²⁸.

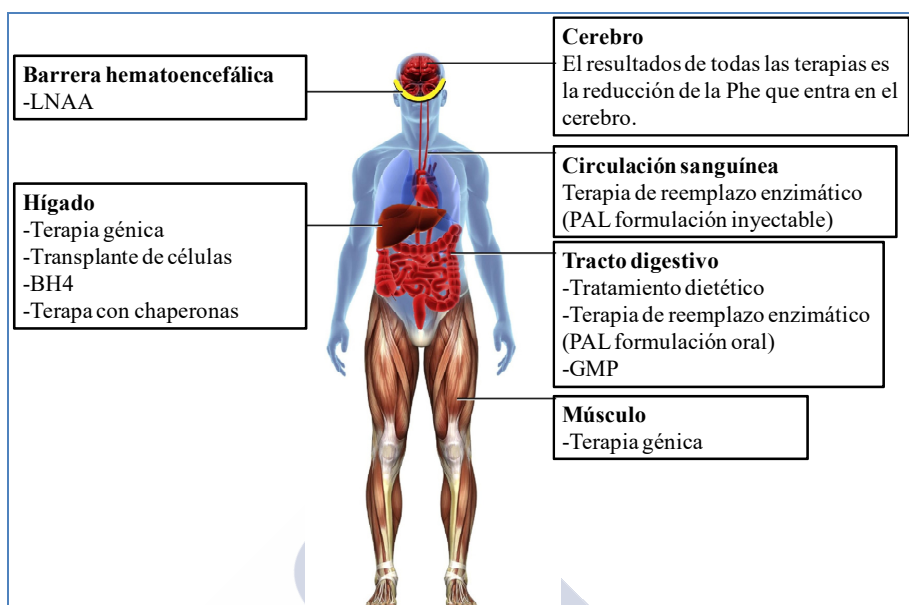


Figura 12: Opciones de tratamiento disponibles para la PKU en la práctica o en teoría, según las diferentes ubicaciones del cuerpo. GMP: glicomacropéptido, PAL: fenilalanina amonio liasa, LNAA: aminoácidos largos neutros. *Modificado de van Spronsen et al*⁶¹

1.10 SEGUIMIENTO:

El seguimiento se debe realizar de por vida, en aquellos pacientes varones con formas benignas podría valorarse el alta entre los 9-12 años si presentan un adecuado control metabólico y un desarrollo psicomotor normal²⁸.

El intervalo de seguimiento en los pacientes con PKU varía según la edad. El primer año porque es necesario instruir a los padres y durante la adolescencia que es donde suele existir un detrimento del control metabólico es importante realizar un control más exhaustivo. La Guía Europea para el diagnóstico y tratamiento de la PKU establece como frecuencia mínima de visitas médicas en pacientes con buen control clínico y metabólico lo siguiente:

- 0-1 año: cada 2 meses
- 1 -18 años 2 veces por año
- Mayores de 18 años: 1 vez por año
- Embarazo: 1 vez por trimestre.

Cuando los pacientes alcanzan una edad y una madurez adecuada, aproximadamente entre los 16 y 18 años, se debe transferir el seguimiento por un especialista de adultos en EMH. Para ello es necesario realizar un proceso de transición programado conjuntamente entre el paciente, los padres y los profesionales.

Para valoración de un adecuado control metabólico en los pacientes con PKU se emplean los niveles de Phe. La Guía Europea recomienda una determinación de Phe en sangre capilar recogida en papel de filtro con la siguiente frecuencia:

- 0 a 12 meses: semanalmente, si MHPA cada 15 días.
- 1-12 años: cada 15 días, si MHPA cada 1-2 meses.
- En mayores de 12 años: mensualmente, si MHPA cada 3-6 meses.

La recogida de la muestra de sangre debe realizarse siempre a la misma hora después de un ayuno nocturno, para evitar las fluctuaciones de Tyr debidas a la ingesta de los suplementos de AA exentos de Phe. En el caso de cambios de tratamiento o procesos intercurrentes (procesos infecciosos, alergia o estrés) se aconseja modificar la frecuencia de la determinación de Phe.

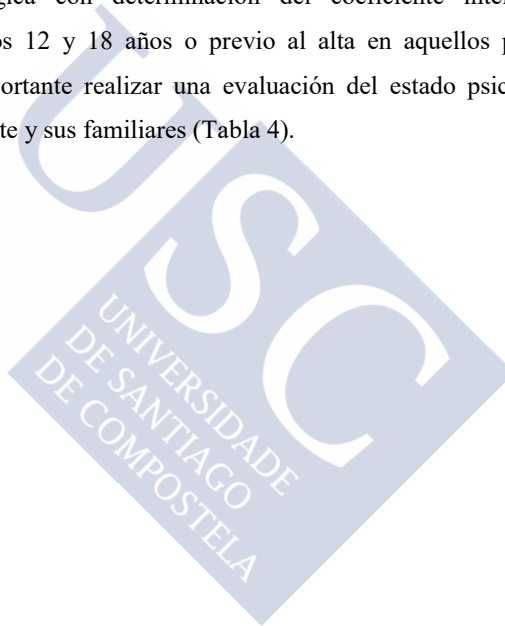
Además de la determinación de los niveles de Phe en sangre es necesario realizar la valoración de los niveles de micronutrientes (vitaminas y minerales, incluido calcio, zinc, selenio) hormonas como la paratohormona (PTH) y biomarcadores como la hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM) y la ferritina en el caso del estudio del hierro; el ácido metilmalónico (AMM) y la homocisteína para valoración del estado de la vitamina B₁₂. La frecuencia variará de cada 1-2 años a 2-3 años según la edad del paciente y las características de la dieta que está realizando.

En cada consulta de seguimiento se debe realizar una exploración física completa que permita detectar signos de mal control metabólico así como una exploración neuropsicológica.

El seguimiento desde el punto de vista nutricional requiere una valoración antropométrica con cálculo de IMC (índice de masa muscular) y exploración física que permita detectar signos clínicos de alteraciones nutricionales, bien por defecto o por

exceso Es importante asegurar que el paciente realice una dieta equilibrada, tanto en relación con el aporte proteico como el resto de nutrientes, para ello se recomienda emplear una encuesta dietética que permita detectar posibles desequilibrios^{27, 28}.

A pesar de un adecuado control los pacientes con PKU tienen mayor riesgo de presentar alteraciones neurológicas y psicológicas⁸⁸. Es imprescindible realizar una valoración neurológica y seguimiento del rendimiento escolar que permita detectar algún problema en este ámbito de forma precoz para ofrecer el soporte necesario. Aparte de la valoración continuada durante el seguimiento de estos pacientes se recomienda una valoración neuropsicológica con determinación del coeficiente intelectual y de funciones ejecutivas a los 12 y 18 años o previo al alta en aquellos pacientes con MHPA. También es importante realizar una evaluación del estado psicológico y de calidad de vida del paciente y sus familiares (Tabla 4).



	Infancia (<12 años)	Adolescencia (12-18 años)	Edad adulta (≥18 años), excluyendo la PKU materna
Visita médica	-0-12 meses: 1 vez al mes Si MHPA cada 3 meses -12-36 meses: cada 3 meses. Si MHPA cada 6 meses. -3-6 años: cada 4 meses -6-12 años: 2 veces/año Si MHPA anual	2 veces al año Si MHPA 1 vez al año	1 vez al año Si MHPA bianual
	Si buen control clínico y metabólico. Visita clínica adicional si fuese necesario.		
Valoración nutricional	Evaluación dietética (registro de alimentos de 3 días o recuerdo de 24 horas) Parámetros antropométricos (peso, altura, IMC) Características clínicas de micronutrientes y deficiencia de Phe en cada visita ambulatoria		
Valoración del control metabólico	<1 año: Phe 1 vez/semanal Si MHPA 1 vez cada 15 días 1-12 años: Phe cada 15 días Si MHPA cada 1-2 meses	Phe mensual Si MHPA cada 3-6 meses.	
	Aumentar la frecuencia si procesos infecciosos, alergia o estrés. AA plasmáticos 1 vez/año		
Valoración nutricional bioquímica	Medición anual: homocisteína o AMM en plasma, o ambos, Hb, VCM, y ferritina; vitaminas y minerales (Vitaminas B ₁₂ y D, calcio, fósforo, zinc y selenio). Hormonas (hormona paratiroidea)		
Densidad ósea	DMO si clínica o riesgo de enfermedad metabólica ósea.	DMO: durante la adolescencia tardía; Repetir al año si anormal.	DMO si clínica o riesgo de enfermedad metabólica ósea.
Exploración neurológica	A los 0, 6, 12 y 36 meses. En mayores de 36 meses bianual.		
Valoración neuropsiquiátrica¹	Prueba neurocognitiva solo si está indicada ²	A los 12 años	A los 18 años
Examen de la función de problemas adaptativos	Evaluación clínica anual		
Valoración del funcionamiento y el bienestar psicosocial y la CVRS	Evaluación clínica anual. Durante la infancia realizar un cuestionario de calidad de vida específico de PKU		
Examen psiquiátrico	Al inicio de síntomas psiquiátricos		
Examen de neuroimagen (RM)	Cuando hay un curso clínico inesperado y / o déficits neurológicos inesperados		

Tabla 4: Requisitos mínimos para el manejo clínico y el seguimiento de pacientes con PKU según la Guía Europea para el diagnóstico y seguimiento de PKU²⁷ (2017) y ajustada según los Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo (AECOM 2018)²⁸

PKU: fenilcetonuria. Phe : fenilalanina. DMO: densidad mineral ósea CVRS calidad de vida relacionada con la salud. IMD: índice de masa muscular, AMM Ácido metilmalónico, Hb: Hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio

¹ Los dominios propuestos de prueba para los efectos tóxicos de Phe son el coeficiente intelectual, la percepción o el funcionamiento visoespacial, función ejecutiva (dividido en control inhibitorio, memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva) y control motor. ² Si clínica neurológica o problemas en la escolarización.

1.11 EVOLUCIÓN

Desde la introducción del tratamiento basado en una dieta restringida en Phe se ha conseguido evitar el deterioro neurológico y físico que presentaban los pacientes con PKU, aun así persisten diferencias sutiles con respecto a la población no-PKU. Se ha visto que los pacientes con PKU tratados presentan un coeficiente intelectual ligeramente inferior y pueden presentar déficits en múltiples aspectos de la función cognitiva y ejecutiva, la memoria de trabajo y problemas de conducta, depresión y baja autoestima⁸⁹⁻⁹¹. Esto se puede ver afectado bien por la enfermedad en sí o por la pesada carga social y económica que conlleva la realización del tratamiento dietético que llega a afectar a la calidad de vida de los pacientes y de las familias⁶².

Durante la infancia la adherencia al tratamiento suele ser buena, dado que los padres controlan la alimentación que reciben los niños. A medida que los niños crecen, la adherencia a la dieta cada vez es más complicada porque las comidas deben planificarse rigurosamente y los niños no pueden elegir los alimentos que consumen habitualmente sus compañeros. En consecuencia, el cumplimiento de la dieta a menudo es pobre, especialmente cuando el paciente llega a la adolescencia, como lo demuestra el mal control de las concentraciones de fenilalanina en sangre en este grupo de edad^{92, 93}. En el caso de los adultos también es muy complicado que se adhieran al tratamiento dietético, muchos suspenden la dieta y son reacios a reiniciarla, lo que supone un desafío continuo en el seguimiento de los pacientes con PKU. La interrupción del tratamiento dietético conlleva un alto riesgo de deficiencias de nutrientes, disfunción cognitiva y emocional, así como problemas de comportamiento⁹⁴.

Por otro lado, el realizar una dieta restringida puede ocasionar también déficits nutricionales⁸. Por ejemplo, el retraso del crecimiento y la osteoporosis de inicio temprano pueden ser causados por deficiencias en sustancias específicas como minerales o vitaminas, en una dieta restringida en Phe⁸¹.

Por tanto, los pacientes con fenilcetonuria tienen riesgo de déficit de micronutrientes, bien por no adherirse a una dieta suplementada con AA libres de Phe, por presentar HPA leve en que se restringe ligeramente las proteínas (sin suplementación con fórmula

de AA sin Phe), por suspender el tratamiento dietético pero aun así no consumir alimentos con proteínas animales o por recibir tratamiento con BH4 con restricción proteína pero sin suplementación con fórmula de aminoácidos exenta de Phe⁵⁹.

Se desconoce la etiología pero hay estudios que describen un aumento de la tendencia al sobrepeso y obesidad en pacientes con PKU^{59, 95-98}. Se cree que las diferentes estrategias de tratamiento, los rangos para las concentraciones de fenilalanina en sangre y la severidad de la PKU pueden alterar las ingestas nutricionales y en última instancia modular el curso del desarrollo de sobrepeso⁵⁹. En este sentido, a pesar de que se ha observado una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de colesterol y fenilalanina⁹⁹, el riesgo cardiovascular puede aumentar en los pacientes con PKU¹⁰⁰. Se ha visto que los niños con PKU bien controlada muestran niveles significativamente más bajos de lipoproteína de baja densidad y apolipoproteína B y niveles altos de adiponectina, que es una hormona derivada del tejido adiposo que previene la inflamación endotelial y la aterogénesis temprana, en comparación con los sujetos control sin PKU¹⁰¹. Si bien estos parámetros favorables sugieren protección contra la aterogénesis y la enfermedad cardiovascular, aproximadamente un tercio de los sujetos con PKU muestran concentraciones plasmáticas totales de homocisteína que superan el percentil 97, lo que sugiere un mayor riesgo de trombosis, aterosclerosis y accidente cerebrovascular^{71, 102}.

En esta línea, diversos estudios han demostrado también que pacientes con PKU presentan una alteración de la capacidad antioxidante, debido por una parte a la restricción dietética, que puede alterar las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, y a la producción de especies reactivas o sustancias inestables o potencialmente dañinas para nuestro organismo debido a la enfermedad en sí misma o a los metabolitos asociados¹⁰³.

El estrés oxidativo tiene muchos efectos nocivos sobre varias funciones biológicas y la exposición prolongada potencia el desarrollo y la progresión de diversas patologías, entre ellas la enfermedad cardiovascular.

1.12 VITAMINAS Y MINERALES EN FENILCETONURIA

Los micronutrientes (vitaminas y minerales) (VM) son compuestos orgánicos (vitaminas) e inorgánicos (minerales) que son necesarios ingerir con la dieta en pequeñas cantidades para mantener las funciones corporales fundamentales (crecimiento, desarrollo, metabolismo e integridad celular). A diferencia de los macronutrientes no son catabolizados para obtener energía y tampoco se utilizan para propósitos estructurales sino que actúan como coenzimas, cofactores o formando parte de la constitución de enzimas¹⁰⁴.

Los pacientes con PKU, como hemos comentado previamente, pertenecen a un grupo de pacientes con riesgo de presentar desequilibrios de micronutrientes.

Los alimentos son fuentes naturales de todos los nutrientes. Está bien establecido que los alimentos con proteínas animales proporcionan valiosas fuentes de micronutrientes biodisponibles y, por lo tanto, ofrecen ventajas nutricionales. En la PKU, con el tratamiento dietético convencional, reciben una pequeña cantidad, según la tolerancia de Phe, de alimentos que contienen proteínas naturales y una fórmula de aminoácidos exenta de Phe. En el caso de la CPKU por ejemplo, el aporte de proteínas puede proceder en casi en el 85% de la ingesta de la fórmula de aminoácidos exenta de Phe y por lo tanto, prácticamente de la mayoría de los VM. Esta estrategia tiene un impacto importante en la ingesta y el estado de nutrientes, siendo necesario suplementarlos.

Alcanzar un estado óptimo de micronutrientes es todo un reto, particularmente cuando una parte sustancial de la ingesta de nutrientes proviene de fuentes no naturales¹⁰⁵.

Los factores que pueden influir en el estado de las VM en pacientes con fenilcetonuria son los siguientes⁵⁹:

- El tipo de dieta
- Tipo de fórmula de suplementación y cantidad de micronutrientes que contiene la fórmula
- Frecuencia en la que se administra la suplementación con fórmula de aminoácidos exenta de Phe (puede variar de una a más de tres veces al día)
- Tratamiento con BH4 y grado de restricción proteica

- Grado de control metabólico del paciente, es decir, si el paciente mantiene o no unos niveles de Phe en sangre dentro de los límites aconsejados.

En la PKU, se han notificado deficiencias de múltiples VM entre los que destacan el déficit de zinc (Zn), selenio (Se), hierro (Fe), calcio (Ca), vitamina D, ácido fólico, vitamina B₁₂ (Vit B₁₂)^{56, 106-109} siendo la causa de ello a veces difícil de identificar.

No siempre las VM están deficitarios en pacientes con PKU, sino por el contrario se encuentran por encima de las concentraciones recomendables, como puede ser el caso del ácido fólico^{107, 110, 111}. Esto sucede porque en ocasiones al prescribir los suplementos de aminoácidos libres de Phe en la cantidad necesaria para lograr los requisitos de proteínas que precisa el paciente conlleva a aportar micronutrientes en mayor cantidad que las RDI¹⁰⁶.

A continuación se muestran las características de los principales micronutrientes que se pueden encontrar alterados en pacientes con fenilcetonuria:

1.12.1 Vitamina B₁₂:

La vitamina B₁₂ actúa como cofactor en dos reacciones metabólicas¹⁰⁵:

- Conversión de metilmalonil-CoA reductasa (MMA-CoA) a succinil-CoA (Succ-CoA), por lo que ante un déficit de vitamina B₁₂ se produce un aumento de metilmalonil-CoA y de su producto de hidrólisis el ácido metilmalónico (Figura 13).
- Síntesis de metionina a partir de homocisteína (Hcy). Además, a partir de la metionina se forma la S-Adenosilmetionina necesaria en el sistema nervioso central donde participa en reacciones de metilación. En esta misma reacción metabólica el metiltetrahidrofolato (mTHF) es transformado a tetrahidrofolato (THF), necesario para la síntesis de ADN. Por lo tanto, el déficit de vitamina B₁₂ y folato conlleva un aumento de Hcy.



La fuente alimentaria de vitamina B₁₂ se encuentra en los productos de origen animal como hígado, riñón, huevo, mariscos (ostras y almejas), pescados (sardina y salmón) y en menor cantidad en carnes (vaca, cordero, cerdo, pollo). En general no se encuentra en alimentos de origen vegetal¹¹³.

Es el déficit de VM en que se han descrito claramente signos clínicos en pacientes PKU. Se manifiesta sobre todo en aquellos pacientes que suspenden la suplementación con fórmula de AA libre de Phe, siguen una dieta de tipo vegana y que continúan consumiendo solo cantidades muy limitadas de proteína natural. Los síntomas y signos

Los pacientes pueden presentar parestesias, alteraciones en la sensibilidad y en la fuerza de las extremidades, reflejos atenuados o exaltados, signo de Romberg y Babinski positivo, ataxia y disminución de la sensibilidad vibratoria y de posición. También

pueden aparecer trastornos del comportamiento desde irritabilidad, pérdida de memoria hasta demencia¹¹⁴.

La determinación de vitamina B₁₂ en suero refleja de forma tardía el déficit de esta vitamina¹¹³. El déficit de B₁₂ se puede manifestar con concentraciones de vitamina B₁₂ en plasma normales, por ello para la valoración de forma adecuada de los niveles de vitamina B₁₂ es recomendable la determinación de Hcy total en plasma y metilmalónico en plasma y orina ya que son marcadores más sensibles de los niveles séricos de B₁₂^{115, 116}.

1.12.2 Ácido fólico

Participa como cofactor en la síntesis de los ácidos nucleicos y es necesario para la división celular y crecimiento. También participa en los procesos de reparación de ADN y aumento de la estabilidad del ADN a través de la metilación¹⁰⁶.

Las principales fuentes alimentarias son las verduras, hortalizas, legumbres, algunas frutas (naranja y plátano) y frutos secos (almendra, avellana y aguacate)¹¹³.

Se han identificado niveles elevados de ácido fólico en sangre en pacientes con PKU^{107, 110, 111, 117}, así MacDonald *et al.* describieron elevadas concentraciones de folato en casi la mitad de los pacientes que reciben una dieta controlada con suplementación vitamínica⁵⁹.

No se conocen problemas derivados de la toxicidad por presentar niveles elevados en sangre de ácido fólico, sin embargo si está descrito que puede enmascarar el diagnóstico de anemia perniciosa, enfermedad producida por la carencia de vitamina B₁₂, inhibir la absorción de Zn e interferir en la acción farmacológica de fármacos anticonvulsivantes y de otros fármacos como el metotrexato^{113, 117}.

Otro problema que se ha asociado al aumento de ácido fólico es la posibilidad de favorecer el desarrollo de lesiones precancerosas¹¹⁸, aunque también se ha visto que el

ácido fólico puede prevenir el cáncer debido a su acción sobre la reparación y metilación del ADN¹¹⁹. Actualmente no hay datos concluyentes¹²⁰.

1.12.3 Selenio

El selenio es un micronutriente esencial que forma parte de la glutatión peroxidasa, enzima necesaria en el sistema de defensa antioxidante celular. Además, forma parte de la estructura de las tiroxina-5-desyodasas implicadas en la síntesis de las hormonas tiroideas y protege frente a la toxicidad de metales pesados como el mercurio, plomo, cadmio, plata y arsénico¹²¹.

El selenio se encuentra con una biodisponibilidad elevada en la carne, pescado, huevos cereales y frutos secos. Sin embargo, presenta baja disponibilidad en vegetales y frutas¹¹³.

Inicialmente no se realizaba suplementación de la fórmula de aminoácidos con Se en los pacientes que recibían tratamiento con dieta restringida en Phe por lo que tener niveles bajos de este micronutriente era un problema bastante frecuente en PKU^{105, 122}. El Selenio se absorbe mejor en su forma orgánica que inorgánica, que es la empleada por las fórmulas suplementadas aminoácidos libre de Phe.

El déficit de selenio puede dar lugar a miocardiopatía, osteoartropatía¹⁰⁹ y también se ha visto que tiene un papel importante en la fisiología de las enfermedades psiquiátricas como la depresión¹²³. No se han llegado a presentar manifestaciones clínicas relevantes en pacientes con PKU¹²⁴, sin embargo si se ha asociado el déficit de Se a un peor rendimiento en las pruebas neuropsicológicas¹²⁵.

1.12.4 Zinc

El Zinc es indispensable para la actividad de numerosas enzimas y funciones corporales, regula la expresión de múltiples genes y participa en el mantenimiento de la integridad estructural de las proteínas¹²⁶.

Se ha observado déficit de Zn de origen nutricional en pacientes que ingieren poca cantidad de proteínas de origen animal (carnes de aves y vacuno, pescado y marisco) asociado a una disminución de la biodisponibilidad del Zn en alimentos con elevado contenido en fitatos como productos vegetales (semillas, leguminosas, tubérculos..)¹²⁶.

El déficit de Zn se asocia con anorexia, retraso en el crecimiento, alteraciones en la maduración sexual, disminución de la cicatrización de heridas, riesgo de infecciones, pérdida de cabello y disminución de la adaptación visual a la oscuridad^{109, 127}.

No hay conclusiones claras sobre los niveles de Zn en pacientes con PKU, hay estudios que refieren valores normales de Zn^{111, 128, 129} pero también se han descrito déficits de Zn en pacientes con PKU a pesar de recibir adecuada suplementación mediante una fórmula de aminoácidos exenta de Phe^{109, 124}. A pesar de ello, no han sido descritos síntomas clínicos en pacientes con PKU debido a déficit de este micronutriente¹⁰⁵.

1.12.5 Hierro

El hierro es un micronutriente esencial ya que participa en un gran número de procesos biológicos indispensables para el ser humano, como el transporte y almacenamiento de oxígeno, la fosforilación oxidativa, el metabolismo de neurotransmisores y la síntesis de RNA y ADN¹³⁰.

El déficit de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial¹³⁰. Se ha descrito déficit de Fe en pacientes con PKU pero en un porcentaje similar a la población general. Hay muchos factores que pueden influir en los niveles de Fe en pacientes con PKU. La mejor biodisponibilidad del Fe se encuentre en la forma hemo (Fe^{+2}) principalmente procedente de la carne roja. El hierro de los alimentos vegetales (Fe^{+3}) se absorbe en muy poca cantidad ya que forma complejos férricos poco solubles¹³⁰.

En pacientes con PKU la fuente principal de Fe es la forma no hemo ya que las fórmulas de aminoácidos exentas de Phe contienen Fe en forma de sulfato ferroso y además los compuestos fenólicos de los vegetales inhiben la absorción de hierro. También la ingesta elevada de calcio puede contribuir a una disminución en la

absorción de hierro. Por otro lado, se ha visto que aquellos pacientes que reciben mayor porcentaje de proteínas naturales tienen menor riesgo de ferropenia¹⁰⁵.

El déficit de Fe de forma crónica y severa se ha asociado con una disminución de la actividad física, deterioro cognitivo, problemas de atención, memoria y aprendizaje. En el caso de los pacientes con PKU no se ha podido establecer si este déficit puede contribuir al deterioro cognitivo de estos pacientes¹⁰⁵.

1.12.6 Calcio, fósforo y vitamina D

El calcio, el fósforo y la vitamina D pertenecen al grupo de micronutrientes que forman parte del organismo, que se obtienen a través de los alimentos y participan en un elevado número de funciones biológicas.

El Ca presenta múltiples funciones en el organismo humano. Además de participar en la integridad estructural contribuyendo a la formación y mantenimiento de los huesos y los dientes junto con el P, magnesio y fluoruro, el calcio es esencial para la transmisión del impulso nervioso, la excitabilidad neuronal, la formación de neurotransmisores, funcionamiento del músculo cardíaco, mantenimiento del tono muscular, regulación de los mecanismos de transporte en las membranas celulares e intracelulares, secreción hormonal, liberación y activación de enzimas, sistema de coagulación y división celular¹³¹.

El P participa también en el mantenimiento de la estructura del esqueleto, pero juega un papel importante en el metabolismo de los hidratos de carbono¹³¹.

La vitamina D actúa principalmente en la regulación de la homeostasis mineral, concretamente en el mantenimiento de la concentración del Ca circulante, pero actualmente se ha visto que también participa regulando procesos de diferenciación, proliferación celular y apoptosis, además se ha descrito su acción a nivel del sistema inmunitario, sistema nervioso o en el sistema renina-angiotensina¹³².

La fuente principal de Ca es la leche y derivados lácteos, pescados, harinas integrales, frutos secos y legumbres. El P se encuentra en forma de fosfato tanto en productos vegetales como animales, siendo las fuentes principales la carne, pescado, leche y derivados, frutos secos, legumbres y cereales¹³¹. Sin embargo, la principal fuente de vitamina D es la endógena, es decir, la que se obtiene por acción de la radiación solar. Otras fuentes de vitamina D son los pescados marinos grasos y en menor proporción los huevos, carne bovina, mantequilla y aceite vegetal. Las plantas, frutas y frutos secos aportan escasa cantidad de vitamina¹³².

Debido al importante número de funciones en las que participa el calcio, existe un complejo sistema de regulación de los niveles de calcio por parte del sistema endocrino. El déficit de calcio puede producirse por insuficiente aporte dietético de este mineral, por la relación baja de Ca/P en la dieta o por déficit de vitamina D. El efecto de la carencia de este micronutriente origina una insuficiente mineralización ósea.

En el caso del P, es raro encontrarse ante un déficit de este micronutriente salvo que existan problemas de regulación, debido a que se puede encontrar en un gran número de alimentos.

El déficit de vitamina D va a originar a su vez, niveles plasmáticos bajos de Ca y P produciéndose por tanto alteraciones en la mineralización ósea. También se ha descrito una mayor incidencia de enfermedades como el cáncer, la enfermedad inflamatoria

La ingesta adecuada de Ca, P y vitamina D, como hemos comentado previamente, son importantes para conseguir una adecuada masa ósea, sin embargo otros factores pueden influir en la densidad mineral ósea (DMO) de los huesos de los pacientes con fenilcetonuria. Se ha descrito mayor riesgo de fracturas y disminución de la DMO en estos pacientes^{109, 133}. Mirás *et al.* observaron que aquellos pacientes con una dieta menos restrictiva en proteína natural presentaron mejor masa ósea, por lo que uno de los factores que pueden influir en la mineralización es la ingesta de proteínas naturales.^{134, 135}. Así, la terapia con BH4 permite una dieta con restricción proteica menos estricta, lo cual se ha asociado a una mejor masa ósea^{134, 135}.

Otras causas de disminución en la DMO de los pacientes con PKU pueden ser la ingesta insuficiente de VM, la falta de aminoácidos esenciales como la prolina muy abundante en el colágeno, los ácidos grasos esenciales deficitarios en PKU¹³⁶, la falta de ejercicio físico, el inadecuado control dietético o por la patología en sí ^{105, 137, 138}.

El empleo de suplementos de micronutrientes ha cambiado gradualmente en los últimos años. En los inicios, el tratamiento dietético de los pacientes con PKU que recibían fórmulas con AA exentos de Phe no venían suplementadas con micronutrientes. Sin embargo, la baja adherencia a la suplementación adicional de micronutrientes así como las dificultades en la disponibilidad para suplementar las VM en estos pacientes ha llevado a añadir micronutrientes y ácidos grasos esenciales a las fórmulas de AA exentas de Phe.

Se desconoce cuál puede ser la fórmula ideal que permita mantener un adecuado soporte nutricional en los pacientes con fenilketonuria, por lo tanto, ante la complejidad de la dieta es importante realizar una monitorización de los niveles de micronutrientes en estos pacientes.

1.13 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular es un proceso que comienza en épocas tempranas de la vida ¹³⁹⁻¹⁴⁴ y va progresando en forma de un remodelado estructural de la microcirculación y un acúmulo celular y lipídico en las grandes arterias, que se complica por la calcificación, la formación de la placa y en último término, por la ruptura de esta como factor precipitante para la formación de trombos y eventos cardiovasculares agudos. Es de gran interés identificar marcadores que permitan determinar la presencia de enfermedad arterial y facilitar la intervención más apropiada y precoz para poder enlentecer la progresión de la enfermedad cardiovascular ¹⁴⁵.

1.13.1 Valoración de la presión arterial

Tradicionalmente se utilizaba la medición de la presión arterial (PA) periférica como parámetro que se correlacionaba con eventos cardiovasculares, actualmente se considera

que en la pared arterial es donde se encuentra el inicio de todo el proceso. La presión arterial central no siempre está representada por la presión a nivel braquial, sobre todo en individuos jóvenes¹⁴⁶ y dado que ésta es la que presenta mayor valor predictor de eventos cardiovasculares sería recomendable el empleo de la medición de la presión a nivel central. Sin embargo, según las últimas guías de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) son necesarias más investigaciones para recomendar la medición de forma rutinaria de la PA central para uso clínico¹⁴³.

Se han introducido una serie de métodos y/o técnicas no invasivas que permiten la valoración del daño arterial, entre ellos se encuentra las técnicas ecográficas para determinar el grosor de la íntima-media y de la composición de la placa de ateroma en la carótida, la tomografía computarizada para la detección y cuantificación de la calcificación de las arterias coronarias, la valoración de la rigidez arterial mediante el análisis de la onda de pulso y la determinación de la velocidad de onda del pulso (VOP) y la valoración de la disfunción endotelial mediante la vasodilatación mediada por flujo o dilatación no dependiente del endotelio^{143, 147, 148}.

1.13.2 La rigidez arterial

La rigidez no es más que una disminución de la elasticidad de los vasos sanguíneos que aumenta con la edad, pero que puede verse acelerado en diversos procesos como la hipertensión arterial, en enfermedades del tejido conectivo, patología metabólica como la diabetes, el hígado graso no alcohólico y la dislipemia, alteraciones en el sueño^{149, 150} y también en la enfermedad renal terminal, entre otros¹⁵¹⁻¹⁵³ (Figura 14).

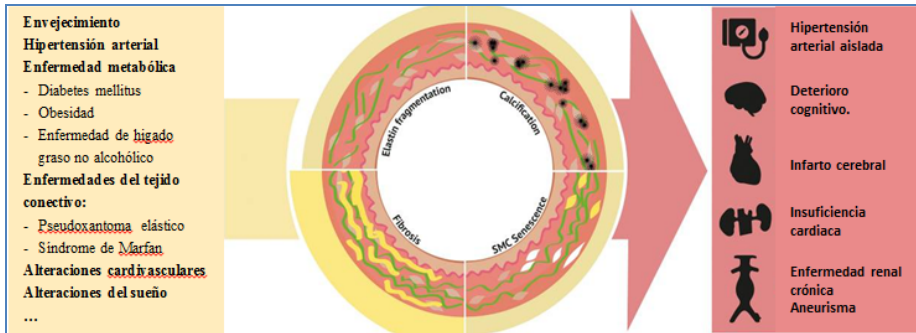


Figura 14: Factores que contribuyen a la rigidez arterial. Condiciones clínicas, mecanismos y efectos asociados con aumento de la rigidez arterial. Las líneas verdes representan láminas elásticas, las áreas amarillas indican fibrosis, manchas negras marcan los depósitos de calcio. Fuente Lyle et al¹⁵¹

La rigidez arterial se ha vuelto cada vez más importante en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. Las propiedades elásticas de las arterias que conducen el flujo sanguíneo varían a lo largo del árbol arterial, siendo las arterias proximales más elásticas y las distales más rígidas. Esta heterogeneidad es originada por la estructura molecular, celular e histológica de la pared arterial, que va a ser diferente según la localización en el árbol arterial. El colágeno y la elastina, así como el músculo liso, son los principales elementos que componen la pared arterial. Las arterias proximales tienen una elasticidad relativamente alta como resultado de una eleva relación elastina-colágeno y una menor influencia del tono del músculo liso. A medida que progresamos hacia la periferia la elasticidad disminuye, van a ir aumentando las fibras musculares y disminuyendo las fibras elásticas para acabar finalmente en los capilares donde la estructura que predomina es el endotelio^{145, 146}.

La pared aórtica presenta una importante capacidad amortiguadora del flujo sanguíneo cardíaco pulsátil conocido como *Windkessel effect*. En la sístole, la pared aórtica que es flexible se estira para acomodar el bolo de sangre expulsado por el ventrículo izquierdo, amortiguando así un aumento en la presión arterial sistólica. En la diástole, el retroceso elástico de la pared aórtica permite que el flujo sanguíneo aórtico sea continuo limitando la caída diastólica de la presión arterial¹⁵¹. Una manifestación funcional importante de la rigidez arterial es una incapacidad progresiva para amortiguar los cambios de presión arterial cíclicos generados por las contracciones cardíacas pulsátiles. La rigidez arterial finalmente conduce a un aumento de la presión arterial sistólica (PAS), así como a una disminución de la presión arterial diastólica (PAD) y por

consiguiente, contribuyen a un aumento de la presión del pulso ($PP = PAS - PAD$). Este aumento de PAS y PP a su vez desempeñan un papel integral en la afectación cardiovascular, como la hipertrofia ventricular izquierda, la insuficiencia ventricular y el proceso aterosclerótico. La disminución de la PAD debido a la rigidez a nivel de la aorta conduce a una alteración en la perfusión coronaria. Las fuerzas pulsátiles aumentadas o no amortiguadas también se extienden a la microcirculación de órganos desprotegidos con baja resistencia vascular, como el cerebro y los riñones¹⁵⁴, dicho aumento en la rigidez arterial se ha asociado con enfermedad de vasos pequeños a nivel renal¹⁵⁵ cerebral¹⁵⁶ con deterioro de la función cognitiva en las personas de edad¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, así como en adultos jóvenes y de mediana edad. Además, se ha visto que la rigidez arterial parcheada asociada a los gradientes de presión generados por la rigidez aórtica resultantes puede desencadenar una remodelación aórtica que conduzca a la formación de un aneurisma aórtico abdominal¹⁶⁰. Es decir, la hipertensión sistólica es un factor de riesgo importante para la enfermedad coronaria, el accidente cerebrovascular, cardiovascular y la mortalidad global. Por lo tanto, no es sorprendente que la determinación de la rigidez arterial también puede predecir el riesgo cardiovascular futuro^{148, 151, 161}. Las directrices de la ESC y la ESH respaldan el uso de técnicas para valorar el aumento de la rigidez arterial, cuando sea posible, como una medida más del riesgo cardiovascular¹⁴³.

1.13.3 Tonometría de aplanamiento

La tonometría de aplanamiento (TA) es una técnica no invasiva, sencilla, reproducible y validada que permite realizar una medición de la VOP y el análisis de la onda de pulso (PWA) como marcadores de rigidez arterial sistémica, ambos predictores de eventos cardiovasculares adversos¹⁶². La rigidez arterial, medida como la VOP y la reflexión de la onda, medida como índice de aumento (AIX), son predictores independientes de morbilidad y mortalidad cardiovascular y total¹⁶¹.

El sistema Sphygmocor ha sido el dispositivo más utilizado y mejor validado para la evaluación de la VOP y la PWA incluso en niños y adolescentes^{163, 164}. Se han establecido los valores normales de VOP y Aix@HR75 para la población pediátrica y adulta¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ (Tabla 5 y Figura 15 y 16).

Categoría según edad	Media (± 2 DE) m/seg	Mediana (P10-P90) m/seg
<30 años	6.2 (4.7-7.6)	6.1 (5.3-7.1)
30-39 años	6.5 (3.8-9.2)	6.4 (5.2-8.0)
40-49 años	7.2 (4.6-9.8)	6.9 (5.9-8.6)
50-59 años	8.3 (4.5-12.1)	8.1 (6.3-10.0)
60-69 años	10.3 (5.5-15.0)	9.7 (7.9-13.1)
≥ 70 años	10.9 (5.5-16.3)	10.6 (8.0-14.6)

Tabla 5: Distribución de la VOP en m/seg según la edad. DE: desviación estándar, P10: límite superior del percentil 10, P90: límite inferior del percentil 90. Fuente¹⁶⁸

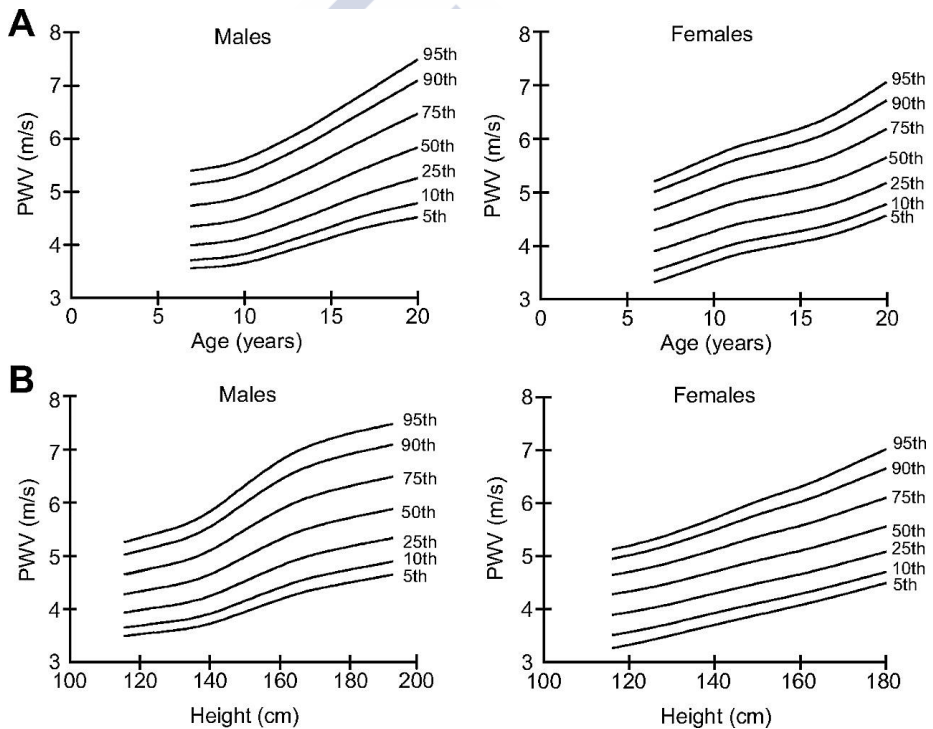


Figura 15: Curva de percentiles de la velocidad de onda de pulso m/s en relación con la edad (A) y el peso (B) en niños y adolescentes. PWV: Velocidad de onda de pulso. Fuente Reux et al¹⁶⁶

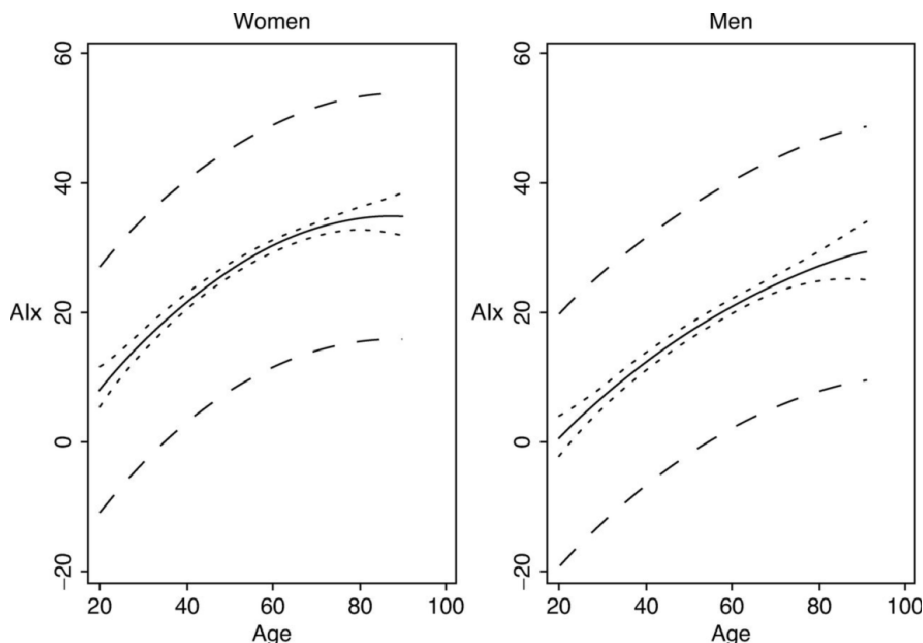


Figura 16: Curva de percentiles de AIX según la edad. Las líneas discontinuas anchas son los límites de predicción del 95% y las líneas discontinuas estrechas son los límites de confianza del 95% de la línea de regresión. Aix: índice de aumento. *Fuente Janner et al*⁶⁹

1.13.3.1 Forma de la onda de presión de pulso

La forma de la onda de presión en cualquier arteria es el resultado de una onda de presión anterógrada originada por un incremento brusco de presión como consecuencia de la sístole ventricular y una onda refleja retrógrada generada por la retracción de la pared arterial tras la distensión previa para albergar la sobrecarga de volumen que llega con cada embolada ventricular y el sistema vascular periférico en la interfase entre las arterias grandes y los vasos de resistencia (arterias y arteriolas), esta onda se desplaza a una velocidad tan alta que se refleja hacia atrás, en dirección a las arterias centrales, durante el mismo ciclo de eyección, solapándose con parte de la onda anterógrada. Como consecuencia, la presión registrada en cualquier lugar del sistema arterial es la suma de la onda anterógrada y la onda refleja¹⁷⁰ (Figura 17).

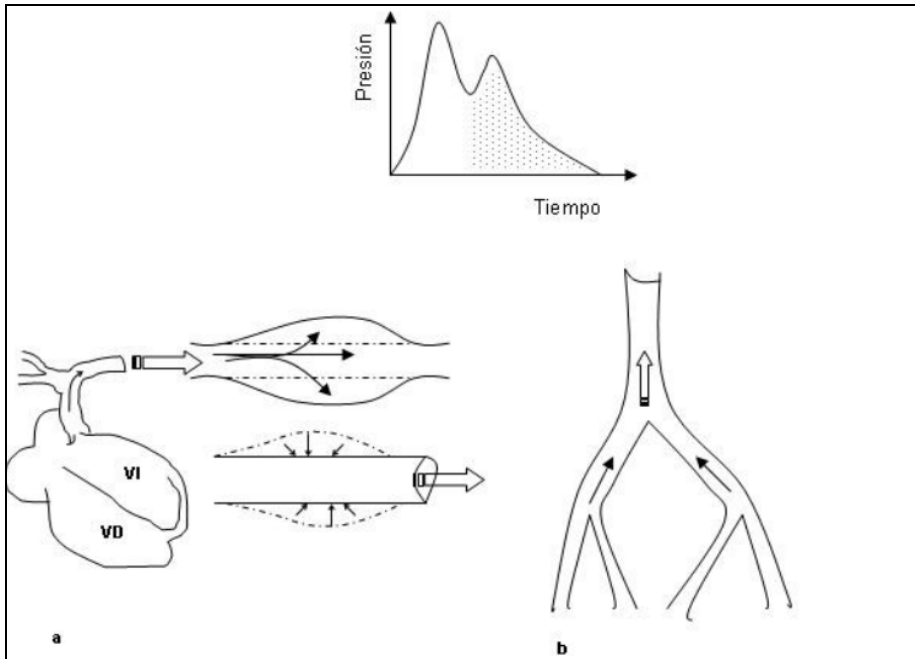


Figura 17: Forma de la onda de pulso. Reflexión de la onda de pulso (área sombreada) como consecuencia de: (a) retracción de la pared vascular tras la sístole ventricular y (b) onda de flujo retrógrado procedente de la circulación periférica. Fuente Hermida-Amêijeiras et al¹⁷¹

Para valorar la forma de la PWA se podría emplear la arteria carótida o la arteria subclavia que se considera que podría ser similar a la onda de pulso central, pero pueden presentarse limitaciones en relación con las características propias a la arteria que se está explorando, como ausencia de plano óseo subyacente, o las del paciente, por ejemplo, obesidad. Generalmente se emplea la tonometría de la arteria radial, que cuenta con una base sólida que es la apófisis estiloides del radio permitiendo realizar un registro fidedigno de la onda de pulso arterial¹⁷¹.

La TA a nivel de la arterial radial se realiza colocando un tonómetro manual sobre la arteria radial y aplicando una ligera presión para aplanar la arteria parcialmente (Figura 18)¹⁷¹ La presión de la arteria radial se va a transmitir entonces desde la arteria al sensor dando lugar a un registro digital (Figura 19 y figura 20)^{170, 171}. Posteriormente se realiza el cálculo o estimación de los índices de presión central mediante un algoritmo matemático o “función de transferencia” validada y aprobada por la American Food and Drug Administration (FDA) para estimación de la PA central¹⁷²⁻¹⁷⁴. Para el cálculo de la

“función de transferencia” se partió de la premisa que la PAD y la presión arterial media (PAM) apenas varían a lo largo del árbol arterial, por lo que se corresponderían la PAD determinada a nivel radial mediante TA con la presión arterial diastólica central (PADc).

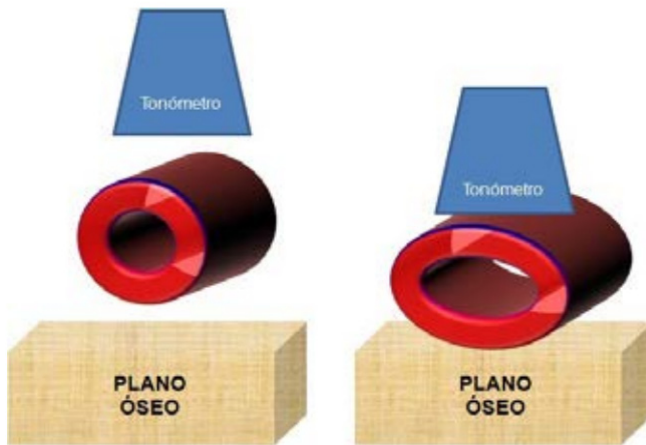


Figura 18: Colocación del tonómetro en el punto donde la pulsación de la arteria radial es de máxima intensidad, una vez localizado el punto es necesario realizar una ligera presión contra estructuras sólidas como en este caso la apófisis estiloides del radio. Fuente *Hermida-Ameijeiras et al*¹⁷¹

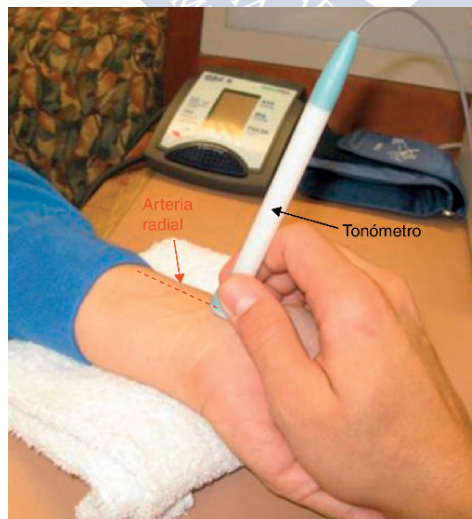


Figura 19: Tonometría de aplanamiento realizada en la arteria radial. Fuente *Arrebola-Moreno et al*¹⁷⁰

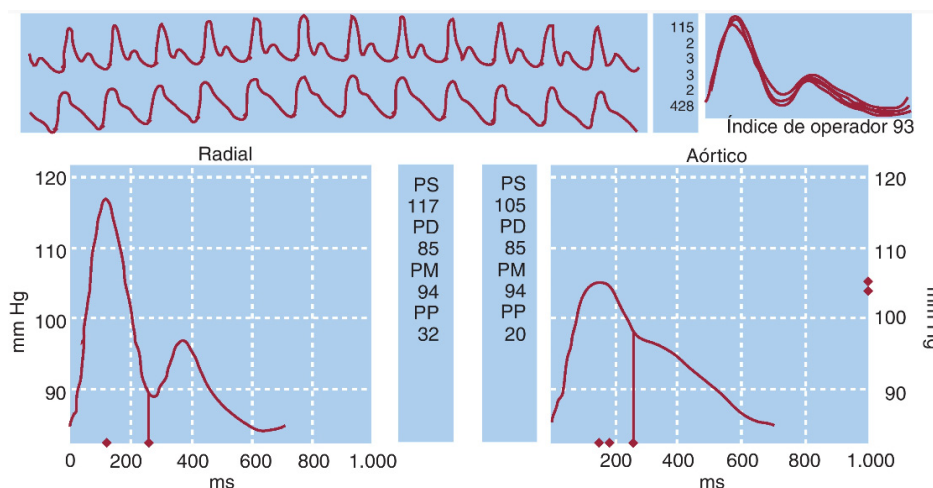


Figura 20: Análisis de la forma de la onda de pulso obtenido del tonómetro de la arteria radial que muestra los trazos de la arteria radial medidos (izquierda) y los trazados aórticos centrales calculados (derecha) Fuente Urbina et al¹⁴⁸

Los índices que se calculan a partir de la onda de presión aórtica obtenida mediante una “función de transferencia” y que permiten valorar el grado de rigidez arterial son los siguientes: (Figura 21)

- PADc: es el valor de PAD a nivel braquial obtenida por esfigmomanometría convencional.
- PAMc: presión arterial media obtenida en arterial braquial mediante esfigmomanometría convencional.
- Presión arterial sistólica central (PASc) que puede diferir en gran medida de la presión sistólica braquial.
- Presión de pulso central (PPc): es la diferencia entre PASc y la PADc. Refleja la circulación sanguínea pulsátil, al contrario que la presión arterial media, que refleja la circulación sanguínea constante, se expresa en mmHg.
- Incremento de presión sistólica (AP): corresponde al aumento de presión que genera la onda de reflexión sobre el pico de PASc.
- Índice de aumento aórtico o índice de potenciación: expresa el porcentaje de PPc causada por la onda de reflexión. En situaciones en las que aumenta la rigidez arterial (envejecimiento, hipertensión arterial, diabetes...) se produce una onda de reflexión precoz, dando lugar a un aumento de PPc y por tanto un aumento del

Aix. Se suele ajustar en función de la frecuencia cardíaca, utilizando un valor estándar de 75 lpm (Aix@HR75). El Aix@HR75 es una medida de rigidez arterial sistema, se correlaciona con otras medidas de rigidez arterial como la VOP¹⁷⁵ y por tanto también predice un aumento del riesgo cardiovascular¹⁷⁶.

- Duración de la eyección: es la distancia que va desde el inicio de la onda de pulso hasta el punto donde inicia el descenso. El índice de viabilidad subendocárdica (SEVR) es el tiempo que transcurre desde la inflexión de la onda hasta que finaliza. Este parámetro que permite distinguir entre la disfunción sistólica y diastólica, por lo tanto se puede emplear para valorar la eficacia de la terapia en la insuficiencia cardíaca congestiva¹⁵².

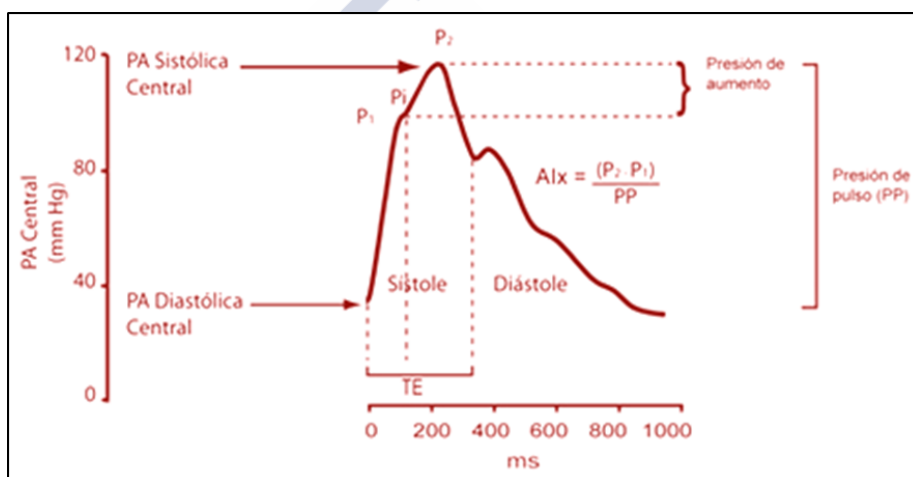


Figura 21: PWA. Parámetros que se obtienen de la valoración de la onda de pulso. El Aix: es el resultado del incremento de presión (P2) generado por la onda de reflexión sobre el pico de presión máxima de la onda primaria (P1). Fuente Boggia et al¹⁷⁷

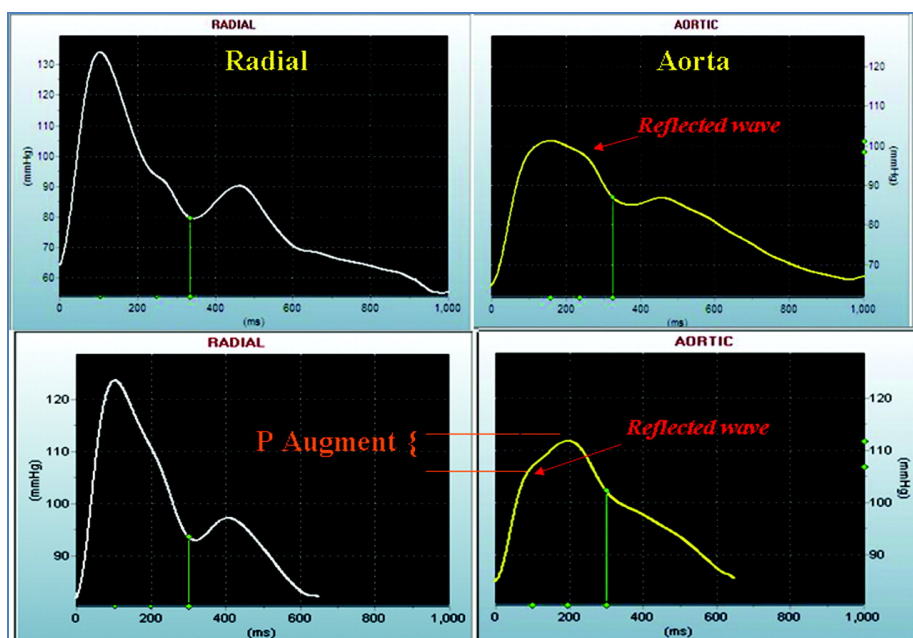


Figura 22: Tonometría de aplanamiento realizado a nivel de la arterial radial. Ejemplo de un paciente sano donde se ve una onda refleja que llega a la diástole (parte superior) y un paciente que presenta aumento de rigidez arterial (parte inferior) donde la onda refleja se encuentra al principio de la sístole. Fuente Urbina et al¹⁴⁸

1.13.3.2 Velocidad de la onda de pulso

La VOP fue descrita por primera vez por Bramwell y Hill¹⁷⁸. La relación entre la VOP y la rigidez arterial viene definida por la ecuación de Moens-Korteweg que relaciona la VOP con la distensibilidad del vaso sanguíneo ($VOP = \sqrt{Eh/2Rp}$, es decir, la VOP es directamente proporcional al grosor de la pared (h) y al módulo de Young de la pared arterial, que establece la relación entre la elastina y colágeno (rigidez arterial) e inversamente proporcional al radio arterial al final de la diástole (R) y la viscosidad de la sangre (p). A mayor espesor y rigidez de la pared, mayor va a ser la VOP y a mayor diámetro del vaso y densidad del fluido menor VOP¹⁷⁰.

La VOP es la velocidad con la que la onda de presión generada en el ventrículo izquierdo se transmite desde la aorta a todo el eje aortoiliaco¹⁴⁵. La valoración de la VOP se realiza mediante la determinación del tiempo que precisa la onda de presión para pasar entre 2 puntos, para ello mediante la TA se realiza un registro a nivel de una

arteria proximal, como la arteria carótida común, y otro registro a nivel de la arteria más distal, como puede ser la femoral. La ubicación superficial de estos vasos facilita que la forma de la onda de presión de pulso se pueda medir fácilmente mediante técnicas no invasivas, y además entre estos dos vasos, la onda de pulso viaja en su mayoría a través de la aorta. El tiempo que pasa entre la llegada de una parte predefinida de la onda de pulso en estos dos puntos se obtiene al pasar al pico de la onda R del complejo QRS del registro electrocardiográfico realizado durante todo el procedimiento. La distancia recorrida por la onda de pulso se mide previamente sobre la superficie del cuerpo y la VOP se calcula como distancia/tiempo (m/s) (Figura 23).

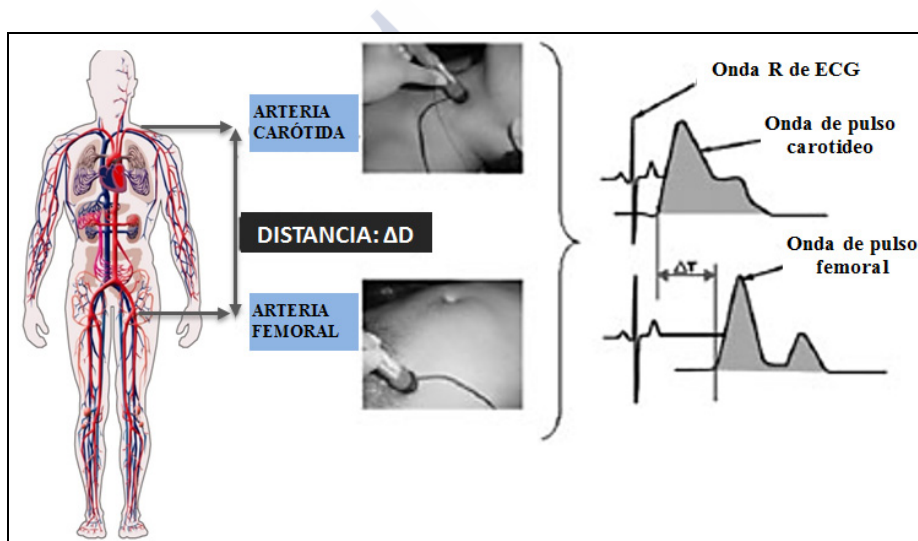


Figura 23: Determinación de la velocidad de onda de pulso mediante tonometría de aplatanamiento. Fuente Espinoza et al¹⁷⁹

1.13.4 La rigidez arterial y patologías con riesgo cardiovascular

Diversos estudios han demostrado el valor predictivo de la VOP en relación a la aparición de eventos cardiovasculares¹⁴⁶. Se ha visto que la VOP y el AIX aumenta en presencia de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos como la diabetes^{150, 180-182}, la hipertensión¹⁸³, la enfermedad renal terminal^{179, 184-187}, dislipemia^{188, 189}, obesidad¹⁹⁰⁻¹⁹⁴ y la edad¹⁹⁵. La AIX y sobre todo la VOP, son predictores independientes, quizás incluso el más fuerte en el caso de la VOP, de eventos cardiovasculares^{143, 145, 148}. A

medida que aumenta la rigidez arterial y el daño vascular aumenta la VOP y el Aix@HR75¹⁶⁴. Por consiguiente la rigidez arterial puede ser considerada un buen marcador de la enfermedad arterial precoz^{143, 146, 166, 196}.

Como ya hemos comentado previamente, la obesidad se asocia con aumento de rigidez arterial. Estudios recientes proporcionaron evidencia de que la obesidad infantil severa se asocia con una disfunción endotelial temprana y una mayor rigidez de las arterias elásticas^{191, 192}. Como resultado de un exceso de adiposidad, en ocasiones sin tener relación con otras comorbilidades relacionadas con la obesidad como la dislipemia o resistencia insulínica cada vez hay más estudios que sugieren un aumento del daño cardiovascular observando en adultos pero también en niños obesos¹⁹⁰.

El tratamiento dietético en los pacientes con PKU podría favorecer el sobrepeso y se asocia a una elevación de los marcadores inflamatorios, con incremento potencial del riesgo de aterosclerosis. A pesar de presentar una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de colesterol y Phe, el riesgo cardiovascular puede aumentar en los pacientes con PKU debido a una mayor prevalencia de sobrepeso/obesidad y una mayor PAS^{100, 197-199}. Se ha visto en un subgrupo de pacientes con PKU obesos o con sobrepeso un perfil lipídico aterogénico¹⁰⁰. Sin embargo, las propiedades elásticas de las grandes arterias, cuya disminución asocia incremento de la morbimortalidad cardiovascular, no han sido previamente estudiadas en pacientes con PKU. La tonometría por aplanamiento podría constituir una herramienta útil para la estimación del riesgo cardiovascular en estos pacientes



JUSTIFICACIÓN





2 JUSTIFICACIÓN

La fenilcetonuria es un error innato del metabolismo de los aminoácidos causado principalmente por una alteración en la enzima fenilalanina 4-hidroxilasa. Esta patología provoca la acumulación de fenilalanina y sus metabolitos (los ácidos fenilpirúvico y feniláctico) en el cerebro, generando daños neurológicos severos e irreversibles en ausencia de tratamiento.

El objetivo del tratamiento en la PKU está dirigido a disminuir los niveles de fenilalanina en el organismo, para ello los pacientes con PKU precisan realizar una dieta restringida en proteínas de alto valor biológico suplementada con fórmula de aminoácidos exenta de Phe, con el consiguiente riesgo de presentar alteraciones nutricionales. De ahí la importancia de suplementar las fórmulas con micronutrientes y ácidos grasos esenciales, con la finalidad de alcanzar un aporte adecuado de proteínas, vitaminas, ácidos grasos esenciales y oligoelementos.

Se desconoce el perfil idóneo de las fórmulas de suplementación. De hecho, existen múltiples tipos de fórmulas con variabilidad en la presencia o ausencia de vitaminas, minerales, lípidos e hidratos de carbono.

Recientes estudios han demostrado también que pacientes con PKU presentan una alteración de la capacidad antioxidante, debido a la restricción dietética y a la producción de especies reactivas o sustancias inestables o potencialmente dañinas para nuestro organismo. El estrés oxidativo tiene muchos efectos nocivos sobre varias funciones biológicas y la exposición prolongada potencia el desarrollo y la progresión de diversas patologías, entre ellas la enfermedad cardiovascular.

Dentro de las estrategias preventivas contra las enfermedades cardiovasculares está la identificación de aquellos individuos en riesgo de sufrir eventos cardiovasculares. Recientemente se han introducido una serie de técnicas no invasivas que permiten evaluar la distensibilidad arterial como la tonometría de aplanamiento.

Parece por tanto de interés en este contexto valorar el estado nutricional de los pacientes con hiperfenilalaninemia, así como determinar el grado de rigidez arterial como medida de riesgo cardiovascular.



OBJETIVOS





3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es valorar el riesgo de alteraciones nutricionales secundarias a una dieta restringida en proteínas de alto valor biológico e identificar la posibilidad de que los pacientes con fenilcetonuria puedan presentar mayor riesgo cardiovascular.

Como objetivos secundarios:

1. Valoración del estado nutricional de pacientes con fenilcetonuria
2. Valoración del estado de micronutrientes (vitaminas y minerales).
3. Valoración del grado de rigidez arterial mediante la morfología de la onda de pulso y velocidad de onda de pulso carótido-femoral.
4. Valoración de posible síndrome metabólico en pacientes con fenilcetonuria.
5. Relacionar los niveles de Phe y el grado de rigidez arterial.



PACIENTES Y MÉTODO





4 PACIENTES Y MÉTODO

Para cumplir los objetivos de este estudio se realizaron 2 estudios observacionales que se basaron en la valoración de pacientes con hiperfenilalaninemia. El primero diseñado para determinar el estado nutricional y niveles de micronutrientes y el segundo diseñado para valorar el riesgo cardiovascular de los pacientes con hiperfenilalaninemia.

4.1 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.

4.1.1 Diseño del estudio:

Estudio observacional de corte transversal con recogida de datos entre febrero y diciembre de 2014.

4.1.2 Sujetos:

La población de sujetos incluidos en el estudio fueron pacientes de ambos sexos entre 7 meses y 42 años con hiperfenilalaninemia detectados mediante cribado metabólico neonatal o diagnóstico tardío. Se confirmó el diagnóstico en todos ellos mediante análisis bioquímico de aminoácidos plasmáticos, actividad eritrocitaria de DHPR y excreción de pterinas. Se realizó asimismo estudio genético.

Criterios de exclusión:

- No realizar un seguimiento continuado del control de su enfermedad
- Padecer una enfermedad hepática o renal
- Presentar alteraciones gastrointestinales que condicionen malabsorción de nutrientes.
- Gestación o lactancia
- Historia de desórdenes alimentarios
- No consentimiento informado (o de sus padres en caso de menores de 16 años)

4.1.3 **Ámbito del estudio:**

La población a estudio comprende pacientes PKU a seguimiento en tres centros españoles: Unidad de Metabolismo del Hospital Universitario La Fe-Valencia, Unidad de Metabolismo del Hospital de Cruces-País Vasco y la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela-Galicia. Los pacientes fueron seguidos en su centro desde el diagnóstico hasta la fecha.

4.1.4 **Variables de estudio:**

Las variables recogidas de cada paciente fueron:

- edad y sexo
- fenotipo de hiperfenilalaninemia (MHPA, PKU leve-moderada, PKU clásica) según los niveles de Phe al diagnóstico: MHPA 120-360 $\mu\text{mol/L}$, PKU leve-moderada 360-1200 $\mu\text{mol/L}$, PKU clásica $> 1200 \mu\text{mol/L}$.
- Estudio genético.
- Momento del diagnóstico: precoz o tardío.
- Realización o no de tratamiento dietético.
- Tratamiento con BH4.
- Tolerancia de fenilalanina: baja $< 500\text{mg/día}$, alta $> 500\text{mg/día}$.
- Mediana de fenilalanina del último año ($\mu\text{mol/L}$). La adherencia al tratamiento en pacientes con PKU fue establecida según su control metabólico por la mediana de los niveles anuales de Phe en sangre y los límites "seguros" pre-establecidos para cada edad. Se consideran niveles adecuados de fenilalanina en sangre en niños menores de 12 años $< 360 \mu\text{mol/L}$ y en mayores de 12 años $< 600 \mu\text{mol/L}$.
- Medidas antropométricas: Peso y talla.
- Determinaciones bioquímicas: prealbúmina (Palb) (mg/dL), Proteínas totales (PT) (g/dL), Se ($\mu\text{g/dL}$), Zn ($\mu\text{g/dL}$), 25-OH VitD (ng/mL), Ca(mg/dL), P (mg/dL), vitamina B₁₂ (pg/mL), ácido fólico (ng/mL), ferritina (ng/mL) y AMM ($\mu\text{mol/mol}$ creatinina)

4.1.5 Planificación del estudio:

- Los sujetos recibieron la información relativa al estudio en el momento que acudieron a los controles, establecidos por protocolo, con objeto de hacer un seguimiento adecuado de su enfermedad. Si accedían a participar en el estudio los pacientes firmaban el consentimiento informado, que en el caso de menores de 16 años el consentimiento informado fue firmado por los padres o tutores legales.
- De los pacientes y/o familias que aceptaron participar en el estudio, se revisaron las historias clínicas en formato electrónico. Se realizó exploración física y valoración nutricional, incluyendo datos somatométricos y encuesta nutricional.

4.1.6 Método:

Los 3 centros siguieron el mismo protocolo de tratamiento²⁰⁰. A los pacientes se les recomendó seguir una dieta que consiste en una reducción marcada de la ingesta de proteínas naturales y suplementada con la mezcla de aminoácidos libre de Phe. La ingesta promedio de proteínas que se recomendó es de 1,3 a 1,5 veces por encima de las recomendaciones dietéticas asignadas²⁰¹. Esta dieta fue evaluada mediante una encuesta de tres días (en algunos incluso semanal) de las cantidades exactas de los alimentos ingeridos en el programa de software ODIMET (organizador dietético metabólico). www.odimet.es. El grupo de pacientes con MHPA, que tenían niveles de Phe al diagnóstico de 120-360µM/L, no precisaban tratamiento y seguían una dieta libre.

En aquellos pacientes que reciben sapropterina (BH4) se recogió la dosis diaria que tomaban (mg/kg).

En cuanto a la valoración antropométrica, el peso y la talla se obtuvieron en la consulta una vez firmado el consentimiento informado. Las mediciones fueron realizadas, en cada centro, siempre por el mismo personal experimentado. La determinación del peso corporal y talla se realizó en estado de ayunas de 12 horas, en ropa interior y sin zapatos. En los menores de 24 meses se determinó la longitud en supino a través de un infantómetro con dos bases, una fija que se orienta en la cabeza y una móvil a nivel de

los pies; el peso a esta edad se midió con báscula para bebés SECA mod. 384, 20 kg clase III, en los mayores de 24 meses para la determinación del peso se utilizó una báscula SECA mod 701 médica electrónica con indicador digital clase III que permitió realizar las mediciones con una precisión de 100g y para la talla se empleó el Estadiómetro Harpenden de lectura directa con contador indicador de fijación a pared, medida de 600-2100mm homologado por la University of London Institute of Child Health y Tallímetro (Tabla plegable modelo 417, SECA de 10-100mm), tomando la medida en cm con una precisión de 1 mm. A partir de estos datos, se calculó el IMC mediante la fórmula $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ (Kg/m^2). Los pacientes menores de 18 años se clasificaron de acuerdo al IMC siguiendo los criterios de la OMS para el desarrollo infantil (bajo peso: IMC en percentil <15; peso normal: IMC en percentiles 15-85, sobrepeso: IMC en percentiles 85-95, obesidad: IMC en percentil >95). Se obtuvieron los correspondientes Z-score de talla, peso e IMC. Los pacientes mayores de 18 años se clasificaron como bajo peso (IMC <18,5), peso normal (IMC 18,5-24,99), sobrepeso (IMC 25-29,99) y obesidad (IMC ≥ 30) según los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud)^{202, 203}.

La toma de muestras para determinación de parámetros bioquímicos se realizó aprovechando extracciones de sangre que precisaban los pacientes que participaban en el estudio. Los análisis de sangre se realizaban siempre a la misma hora mediante punción endovenosa, estando los pacientes libres de cuadros infecciosos agudos y sin medicación, excepto aquellos pacientes que recibían tratamiento con BH4.

Para la determinación de los niveles de Phe en muestra de sangre impregnada en papel (Whatman 903) se utiliza un espectrómetro de masas en tándem API 2000 ESI-MSMS (AB SCIEX) acoplado a un HPLC Perkin-Elmer Series 200. Para la determinación de Phe en plasma se emplea la Cromatografía de Intercambio Iónico con un autoanalizador de aminoácidos Biochrom 30. Las concentraciones de proteínas totales, Ca y P fueron realizadas por procedimientos estándar con el analizador Advia 2400 (Siemens Diagnostic Systems, Alemania), 25-OH VitD, B₁₂ y ácido fólico con Advia Centaur XP Analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemania), prealbúmina a través de nefelometría en un BNII Analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen,

Alemania), Zn con 7700 ICP-Mass Spectrometry (Agilent, CA, EE. UU.) y Se por Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (Perkinelmer, Massachusetts, Estados Unidos). La determinación de ácido metilmalónico en orina se realizó con un espectrómetro de masas en tándem API 4000 ESI-MS/MS (AB SCIEX) acoplado a un HPLC Agilent Technologies Serie 1200 con columna (Gemini 3µm C6-phenyl 110A).

Los intervalos de referencia empleados para los niveles de micronutrientes fueron (validados según edad del paciente): proteínas totales: 6,3–8,5 g/dL; Ca: 8,7–10,8 mg/dL; P: 2,6–5,9 mg/dL, Palb: 21–41 mg/dL; vitamina B₁₂: 180–1900 pg/mL; ácido fólico: 3–17,5 ng/mL; 25-OH VitD: 20–42 ng/mL; ferritina: 14–325 ng/mL; Zn: 65–140 mg/dL; Se: 60–125 mg/L; AMM <13 µmol/mol creatinina.

4.1.7 Análisis estadístico:

Para determinar asociaciones y/o diferencias significativas entre las diferentes variables medidas, se aplicaron los siguientes métodos: en primer lugar, si las variables seguían una distribución normal utilizamos las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Si una de las variables eran cuantitativa y la otra cualitativa, aplicamos la prueba t-Student si la variable cuantitativa seguía una distribución normal y el caso contrario se utilizó la prueba de Wilcoxon de la suma de los rangos. Si ambas variables eran cuantitativas, empleamos un modelo de regresión lineal. La comparación entre grupos se realizó mediante ANOVA o Kruskal-Wallis según si la variable cuantitativa era normal o no. En el caso de que ambas variables fueran cualitativas, utilizamos la prueba exacta de Fisher. Finalmente, ajustamos los valores p obtenidos utilizando la corrección Benjamini-Hochberg. Solo los valores p inferiores a 0,05 se consideraron significativos. El análisis estadístico se realizó con R Core Team, versión 3.2.3. (Core Team 2015).

4.2 VALORACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON FENILCETONURIA MEDIANTE LA MEDICIÓN DEL GRADO DE RIGIDEZ ARTERIAL.

4.2.1 Diseño del estudio:

Estudio transversal con recogida de datos entre octubre del 2015 a julio del 2016

4.2.2 Sujetos:

Los pacientes incluidos en el estudio fueron pacientes de ambos sexos entre 6 años y 50 años con fenilcetonuria detectados mediante cribado metabólico neonatal o diagnóstico tardío. Se confirmó el diagnóstico en todos ellos mediante análisis bioquímico de aminoácidos plasmáticos, actividad eritrocitaria de DHPR y excreción de pterinas. Se realizó asimismo estudio genético.

Criterios de exclusión:

- No realizar seguimiento en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas de nuestro Centro.
- Realizar cambios en la composición de los aminoácidos de la dieta los meses previos.
- Padecer una enfermedad cardiovascular (enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular o revascularización periférica)
- Recibir tratamiento con estatinas o antihipertensivos.
- Gestación o lactancia
- No consentimiento informado (o sus padres en caso de menores de 16 años)

Se estableció también un grupo control con el mismo número de sujetos sanos de similares características en cuanto a edad y sexo.

4.2.3 Ámbito del estudio:

La población comprendía pacientes PKU a seguimiento en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela-Galicia. Los pacientes fueron seguidos en el Centro desde el diagnóstico hasta la fecha.

El grupo control procedía de sujetos que acudían a otras consultas por problemas menores o a realizar análisis preoperatorio de problemas menores.

4.2.4 Variables de estudio:

Las variables recogidas de cada paciente fueron:

- Edad y sexo
- Estudio genético.
- Momento del diagnóstico: precoz o tardío.
- Fenotipo de fenilcetonuria (PKU leve-moderada, PKU clásica) según los niveles de Phe al diagnóstico: PKU leve-moderada 360-1200 $\mu\text{mol/L}$, PKU clásica $>1200 \mu\text{mol/L}$.
- Realización o no de tratamiento dietético.
- Tratamiento o no con BH4.
- Tolerancia de fenilalanina (mg/día): tolerancia baja $<500 \text{ mg / día}$, alta $> 500 \text{ mg/día}$.
- Niveles medios anuales de Phe en sangre (niveles de Phe en sangre considerados adecuados para niños menores de 12 años de edad $<360 \mu\text{mol/L}$ y $600 \mu\text{mol/L}$ en los mayores de 12 años).
- Medidas antropométricas: peso, talla, circunferencia de cintura (CC).
- Presión arterial: PAS, PAD, frecuencia cardíaca (FC)
- Análisis de PWA y VOP carótico-femoral, PPc, PADc, PASc, AP, AIXHR75
- Determinaciones bioquímicas: lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), colesterol total.

4.2.5 Planificación del estudio:

Los pacientes con fenilcetonuria que cumplían los criterios para participar recibieron la información relativa al estudio en el momento que acudieron a los controles, establecidos por protocolo, con objeto de hacer un seguimiento adecuado de su enfermedad. En el caso de los controles, cuando acudían a las consultas se les informaba de las características del estudio.

Si accedían a participar en el estudio los sujetos firmaban el consentimiento informado, y en el caso de menores de 16 años el consentimiento informado era firmado por los padres o tutores legales.

En los pacientes que aceptaron participar, se revisaron las historias clínicas en formato electrónico.

4.2.6 Método:

Se realizó una exploración física, valoración nutricional, incluyendo datos somatométricos y encuesta nutricional, determinación de tensión arterial (medición de presión arterial periférica mediante esfigmomanómetro y presión arterial central mediante tonometría por aplanamiento).

En cuanto a la valoración antropométrica, el peso y la talla se obtuvieron en la consulta una vez firmado el consentimiento informado y las mediciones se efectuaron de modo similar que en la valoración previa. La CC se midió mediante una cinta inextensible en el punto medio entre el margen inferior de la última costilla y la cresta ilíaca. Los resultados de estas mediciones, expresado en cm, se estratificaron en función del sexo y la edad según las referencias de Galinut en los niños²⁰⁴. Para adultos, se emplearon valores específicos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) para el perímetro de cintura²⁰⁵.

La adherencia al tratamiento en pacientes con PKU fue establecida según su control metabólico por la mediana de los niveles anuales de Phe en sangre y los límites

"seguros" pre-establecidos para cada edad. Se consideran niveles adecuados de fenilalanina en sangre en niños menores de 12 años $< 360 \mu\text{mol/L}$ y en mayores de 12 años $< 600 \mu\text{mol/L}$.

A los pacientes se les recomendó seguir una dieta que consiste en una reducción marcada de la ingesta de proteínas naturales y suplementada con la mezcla de AA exenta de Phe. La ingesta promedio de proteínas que se recomendó es de 1,3 a 1,5 veces por encima de las recomendaciones dietéticas asignadas (RDA)²⁰¹. Esta dieta fue evaluada mediante una encuesta de tres días (en algunos incluso semanal) de las cantidades exactas de los alimentos ingeridos en el programa de software ODIMET (organizador dietético metabólico) www.odimet.es.

En aquellos pacientes que habían recibido sapropterina (BH4) se recogió la dosis diaria que tomaban (mg/kg). Para la valoración de la PA se tuvo presente que no habían practicado ninguna actividad física o consumido bebidas con cafeína previamente. Se mantuvieron en posición supina durante 5 minutos y se valoró con un esfigmomanómetro (Omron IT-750; Omron Healthcare, Tokyo, Japan), utilizando un manguito de tamaño apropiado. Se realizaron 3 determinaciones de la PA en los 2 brazos simultáneamente, se repetía 3 veces en el brazo donde la PA era más alta y se hacía un promedio de los 2 últimos valores, siendo ésta la cifra de PA que se iba a utilizar para el análisis de los datos.

El análisis de PWA se realizó mediante una técnica no invasiva con el dispositivo SphygmoCor (AtCor Medical, Sydney, Australia). Se empleó la tonometría de aplanamiento de la arteria radial derecha para obtener la estimación de los índices de presión central a través de un algoritmo matemático o "función de transferencia" validada y aprobada por la FDA para la estimación fidedigna de la presión arterial central²⁰⁶. Se calculó la PAsc y PADc, PPc y la AP, expresando los valores en mmHg y también el Aix@HR75 expresando el valor en porcentaje. Se determinó también la VOP carótido-femoral como índice de rigidez aórtica y expresada como metros por segundo. A la hora de establecer los valores normales y $>$ del percentil 90 se emplearon los valores de referencia para Arterial Stiffness¹⁶⁸. Los sujetos menores de 18 años

fueron clasificados de acuerdo con los valores de referencia previamente reportados por Reusz *et al*¹⁶⁶.

La calidad de las ondas de pulso fue evaluada por el clínico tanto visualmente (en la pantalla de la PC) como numéricamente mediante la puntuación del índice de calidad incorporado SCOR-Px, QI% (derivado de altura del pulso, variación de la altura del pulso y variación diastólica). Solamente se incluyeron en el análisis aquellas mediciones de alta calidad, definidas como un índice de calidad en el dispositivo de al menos 80% (derivado de un algoritmo que incluye promedio de la altura del pulso promedio, variación de la altura del pulso, variación diastólica y tasa máxima de aumento de la forma de onda periférica).

Para definir y estadificar la hipertensión arterial en niños y adolescentes se utilizó el 4º informe del grupo de trabajo del National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) en niños y adolescentes. US National High Blood Pressure¹⁶⁴ definiendo hipertensión arterial como una PASy/o PAD > percentil 95 para sexo, edad y talla. Si la PAS o PAD estaban entre el percentil 90 al 95 se consideró prehipertensión¹⁶⁴. El diagnóstico de hipertensión arterial en sujetos adultos se estableció de acuerdo a la definición de hipertensión arterial proporcionada por las guías de la ESH y ESC¹⁴³.

La toma de muestras para determinación de parámetros bioquímicos se realizó aprovechando extracciones de sangre que precisaban los sujetos que participaban en el estudio. Los análisis de sangre se realizaban siempre a la misma hora mediante punción endovenosa, estando los pacientes libres de cuadros infecciosos agudos y sin medicación, excepto aquellos pacientes que recibían tratamiento con BH4.

Para la determinación de los niveles de Phe en muestra de sangre impregnada en papel (Whatman 903) se utilizaba un espectrómetro de masas en tándem API 2000 ESI-MSMS (AB SCIEX) acoplado a un HPLC Perkin-Elmer Series 200. Para la determinación de Phe en plasma se emplea la Cromatografía de Intercambio Iónico con un autoanalizador de aminoácidos Biochrom 30. Las concentraciones de triglicéridos, colesterol total, HDL se determinaron mediante procedimientos estándar con Analizador

Advia 2400 (Siemens Diagnostic Systems, Munich Alemania), la LDL se estimó a partir de la fórmula de Friedewald (colesterol total de triglicéridos/5-HDL) cuando los triglicéridos eran < 350 mg/dL. Si la concentración de triglicéridos era > 350 mg/dL, LDL se estimó por un método directo basado en colesterol oxidasa, esterasa y peroxidasa, después de la eliminación de colesterol lipoproteico distinto de LDL (Advia 2400, Siemens). Se estableció como niveles elevados un colesterol total >200 mg/dL, LDL >130 mg/dL y triglicéridos >100 mg/dL en pacientes entre 0 y 9 años y triglicéridos >130 mg/dL en pacientes mayores de 10 años. Concentraciones bajas de triglicéridos si los niveles <30 mg/dL y de HDL <40 mg / dL.

4.2.7 Análisis estadístico:

A la hora de evaluar asociaciones y/o diferencias significativas entre las variables, se aplicaron los siguientes métodos: En primer lugar para determinar si las variables cuantitativas seguían una distribución normal se utilizó el test Shapiro-Wilk. Si una de las variables era cuantitativa y la otra cualitativa, empleamos el test t-Student si la variable cuantitativa seguía una distribución normal y en el caso contrario se utilizó la prueba de Wilcoxon de la suma de los rangos. Si ambas variables eran cuantitativas, utilizamos la correlación de Pearson si procedían de una distribución normal bivalente y la Rho de Spearman si no procedían. Si ambas variables eran cualitativas, se aplicó la prueba exacta de Fisher. La comparación entre grupos se realizó mediante ANOVA o Kruskal-Wallis según si la variable cuantitativa era normal o no.

Finalmente todos los valores de p se ajustaron usando la corrección Benjamini-Hochberg. Se consideraron significativos los valores inferiores a 0,05. El análisis estadístico se realizó con R Core Team, versión 3.2.3. (Core Team 2015).

4.3 ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

El protocolo de los estudios fue elaborado de acorde a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial 1964 y ratificaciones de las asambleas siguientes sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y fue aprobado por

el Comité de Ética Autonómico de Galicia, en Santiago de Compostela (registro 2015/393).

Los participantes otorgaron su consentimiento antes de que cualquier intervención relacionada con el estudio fuese realizada, en el caso de los menores de 16 años fue firmado por los padres o tutores legales.

En este trabajo el autor declara no tener conflicto de intereses.



RESULTADOS





5 RESULTADOS

5.1 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.

5.1.1 Características de los sujetos:

Durante el período de reclutamiento se incluyeron en el estudio un total de 156 pacientes con fenilcetonuria que presentaban un seguimiento constante en 3 Centros con Unidad de Enfermedades Metabólicas Hereditarias de referencia nacional, excluyéndose previamente todos aquellos pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión.

Del total de pacientes incluidos el 46,8% fueron hombres y 53,2 % mujeres, con un rango de edad entre 7 meses y 42 años, de los cuales 84 (53,8%) tenían menos de 12 años (Figura 24).

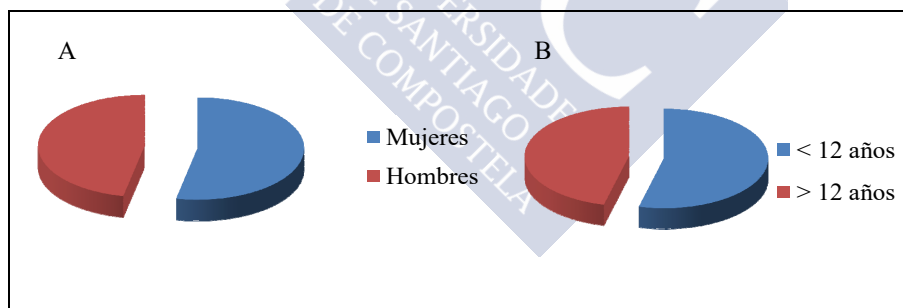


Figura 24: Clasificación según sexo (A) y según edad (B)

Se incluyeron tanto pacientes diagnosticados mediante el cribado neonatal, que correspondían al 88,5% como con un diagnóstico tardío (11,5%). El 21,8% de los sujetos del estudio fueron diagnosticados de MHPA y 78,2% de PKU. Dentro los pacientes con PKU, el 70,5 % presentaban CPKU y el 29,5% MPKU (Figura 25).

En relación a la terapia con BH4, estaban recibiendo tratamiento el 18,8% de los pacientes, de los cuales el 91,3% eran MPKU (Figura 26).

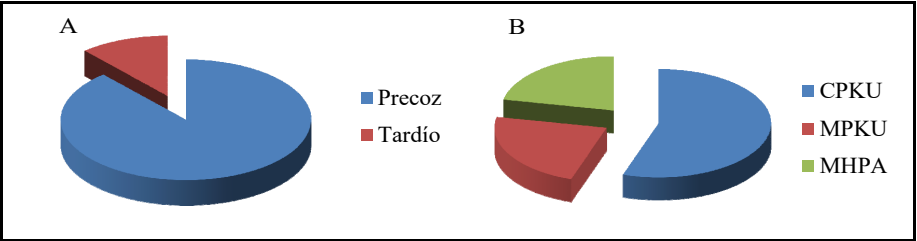


Figura 25: Momento del diagnóstico (A) y fenotipo (B)

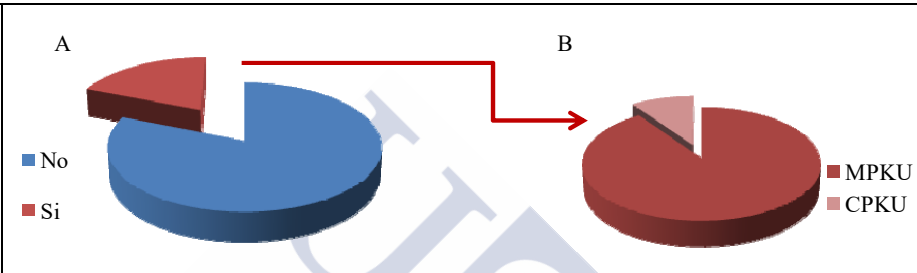


Figura 26: Porcentaje de pacientes que recibían tratamiento con BH4 (A) y fenotipo de los pacientes que recibían tratamiento (B).

5.1.2 Valoración antropométrica

En relación con la valoración antropométrica se objetivó que el 43,6% (68) de los pacientes no tenían un IMC adecuado, mostrando un valor por debajo del límite inferior en el 4,4% (7) y por encima del límite superior el 39,1% (61). 46% (28) de ellos presentaba sobrepeso y 54% (33) obesidad (Tabla 6).

	Bajo peso	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad
Nº pacientes	7	88	28	33
Porcentaje	4,4	56,4	17,9	21,15

Tabla 6: Clasificación de los pacientes en función de Índice de Masa Corporal

5.1.3 Valoración dietética y nutricional

En cuanto a la adherencia a la dieta se observó que el 95,5% de los 54 pacientes con PKU menores de 12 años presentaban una adherencia a la dieta adecuada con niveles de

Phe $<360\mu\text{mol/L}$, mientras que en los 68 pacientes mayores de 12 años se encontró baja adherencia a la dieta, con niveles de Phe $> 600\mu\text{mol/L}$, en el 31,2% (21), siendo 91,7% (22) de ellos mayores de 18 años (Tabla 7).

De los 23 pacientes que reciben tratamiento con BH4 sólo 2 (8.7%) tenían niveles de Phe ligeramente por encima del límite recomendado para su edad.

	Adherencia adecuada a la dieta	Mala adherencia a la dieta
PKU < 12 años, N (%)	52 (95,5)	2 (4,5)
PKU >12 años, N (%)	48 (68,8)	21 (31,2)
Tratamiento BH4, N (%)	21 (91,3)	2 (8,7)

Tabla 7: Control metabólico en los pacientes fenilcetonúricos. PKU: fenilcetonuria.

Hasta un 81,4% (127) de los pacientes del estudio tenían valores alterados en uno o varios parámetros bioquímicos evaluados. El 58.3% eran CPKU, el 21.7% MPKU y el 20% de pacientes con MHPA. Curiosamente, de los pacientes con parámetros bioquímicos alterados, el 84.2% tenía adherencia adecuada a la dieta (Figura 27).

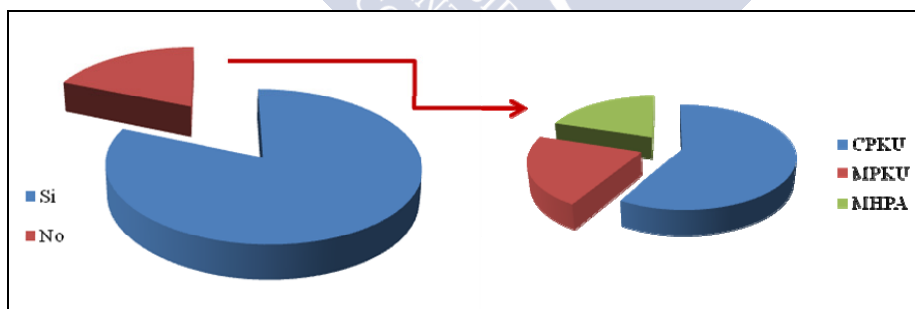
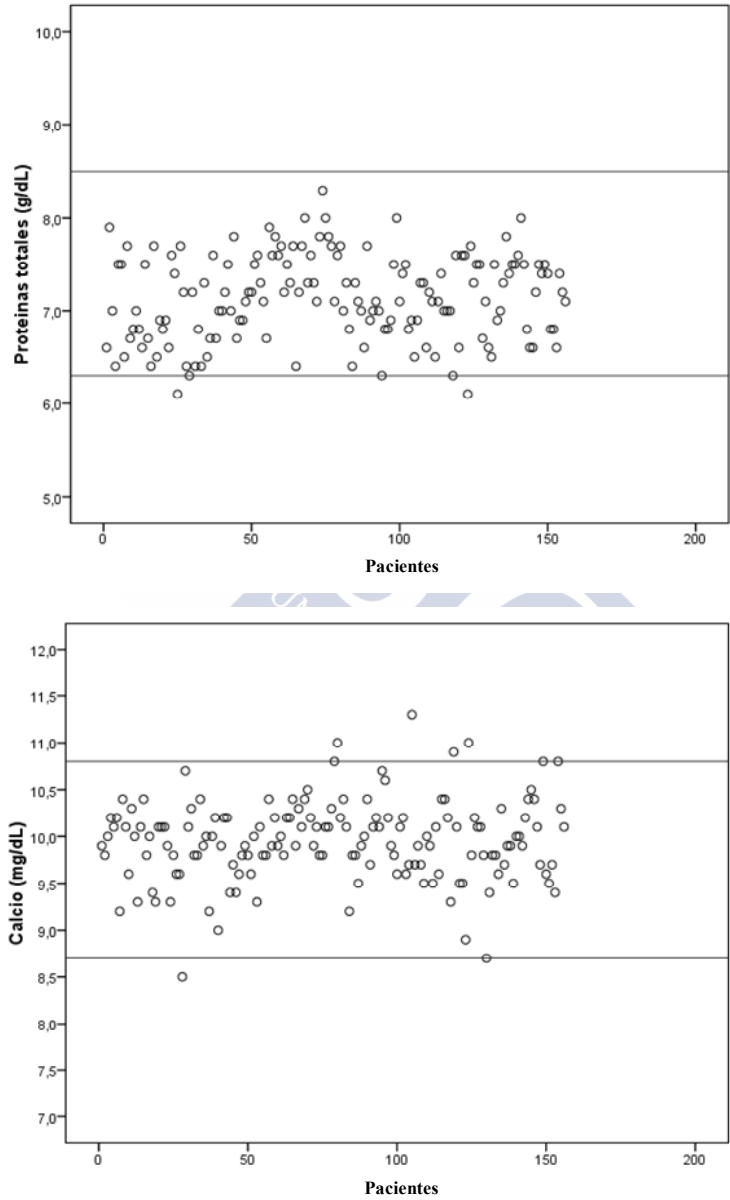


Figura 27: Parámetros bioquímicos alterados y clasificación según fenotipo.

Los niveles de PT, Ca, P, B₁₂ se encontraban en rango normal en casi todos los pacientes (Figura 28). Se detectaron niveles de ferritina y Zn por debajo del límite en 12 (7.7%) y 8 (13%) pacientes respectivamente, de los que prácticamente en su mayoría, 11 pacientes en el caso de la ferritina y 7 en el caso del Zn, tenían un buen control

metabólico (Tabla 8). Las VM más alterados en un mayor % de pacientes fueron la Palb, Se, 25-OH vitD y ácido fólico (Tabla 9, Figura 29).



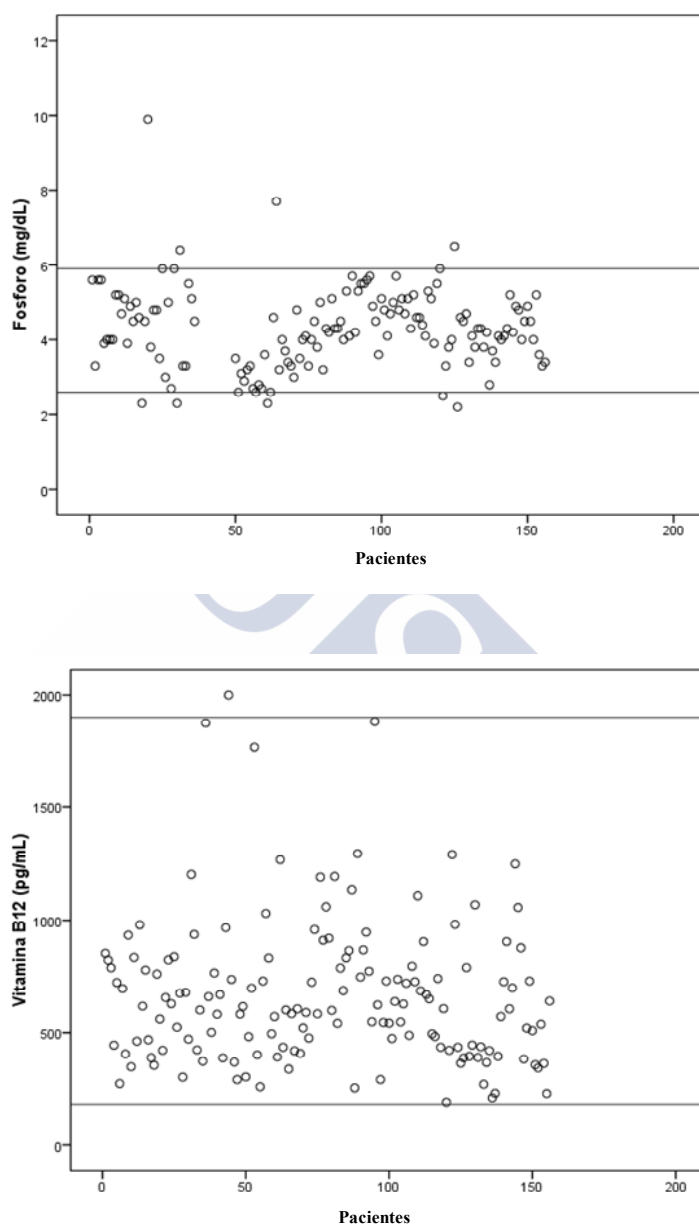


Figura 28: Concentraciones de proteínas totales, calcio, fósforo y vitamina B₁₂ en los pacientes del estudio.

	Total de pacientes	CPKU	Tratamiento con BH4	Tolerancia de Phe de menos de 500mg/día	Adherencia adecuada al tratamiento
Ferritina (< 14 ng/mL)	7,7% (N=12)	41,7% (N=5)	16,67% (N=2)	25% (N=3)	91,7% (N=11)
Zn (< 65µg/dL)	5,1% (N=8)	50% (N=4)	0% (N=0)	37,5% (N=3)	87,5% (N=7)

Tabla 8: Porcentaje de pacientes con ferritina y Zn fuera de rango con respecto al fenotipo, tratamiento con BH4, tolerancia a la Phe y adherencia al tratamiento. Zinc: Zn, Fenilcetonuria clásica: CPKU.

	Total de pacientes	CPKU	Edad (<18 años)	Suplemen- to de BH4	Tolerancia de Phe de menos de 500mg/día	Adherencia adecuada al tratamiento
Palb (<21mg / dL)	34,6% (N=54)	53,7% (N=29)	94,4% (N=51) (<i>p</i> <0,001) *	12,9% (N=7)	50% (N=27)	96,3% (N=2) (<i>p</i> =0,001) *
Fólico (>17,5ng/mL)	39% (N=61)	65,6% (N=40) (<i>p</i> <0,001) *	63,9% (N=39)	11,5% (N=7)	60,7% (N=37) (<i>p</i> =0,013) *	81,9% (N=50)
Se (<60µg/dL)	25% (N=39)	76,9% (N=30) (<i>p</i> <0,001) *	69,2% (N=27)	2,6% (N=1) (<i>p</i> =0,026) *	69,2% (N=27) (<i>p</i> =0,007) *	76,9% (N=30)
25-OH vitD (<20ng/mL)	14% (N=22)	40,9% (N=9)	63,6% (N=14)	9,1% (N=2)	40,9% (N=9)	86,4% (N=19)

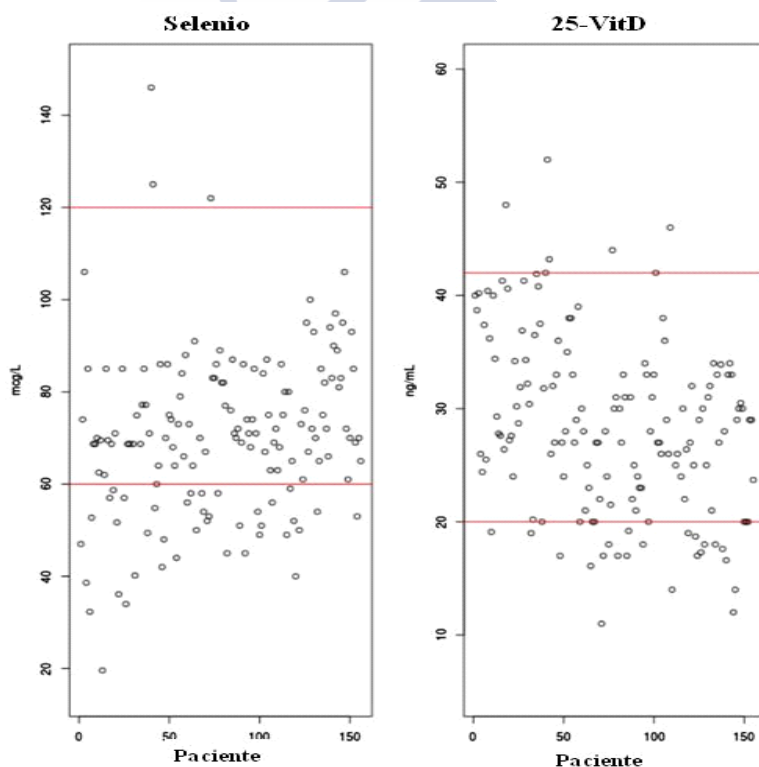
Tabla 9: Porcentaje de pacientes con parámetros bioquímicos fuera de rango con respecto a la edad, el tratamiento con BH4, la tolerancia a la Phe, el fenotipo y la adherencia al tratamiento.*estadísticamente significativo. CPKU: fenilcetonuria clásica, Phe: fenilalanina, Palb Prealbúmina, Se Selenio, 25-OH vitD: 25-hidroxi vitamina D.

El 34,6% (22) de los pacientes presentaron niveles por debajo de los límites aceptados como normales de Palb, prácticamente la mitad de ellos eran CPKU (53,7%) y un 96,3% tenían una adherencia adecuada a la dieta, también pudimos observar que era más frecuente en los menores de 18 años.

Se objetivaron niveles de Se por debajo del rango de normalidad en el 25% de los pacientes, más frecuente (76,9%) en CPKU y con adecuado control dietético, pero sólo estaba alterado en el 2,6% de los pacientes bajo tratamiento BH4.

La 25-OH vitD se encontró disminuida en concentraciones de insuficiencia y/o deficiencia en el 14% del total de pacientes, siendo también más frecuente en pacientes con adecuado cumplimiento de la dieta.

No se halló ningún paciente con deficiencia de ácido fólico en nuestra cohorte, sin embargo 61 sujetos, que representan el 39% de los pacientes, presentaron concentraciones de ácido fólico por encima del límite superior, de ellos 65,6% con PKU clásica, de los cuales el 82% tenían una adecuada adherencia a la dieta.



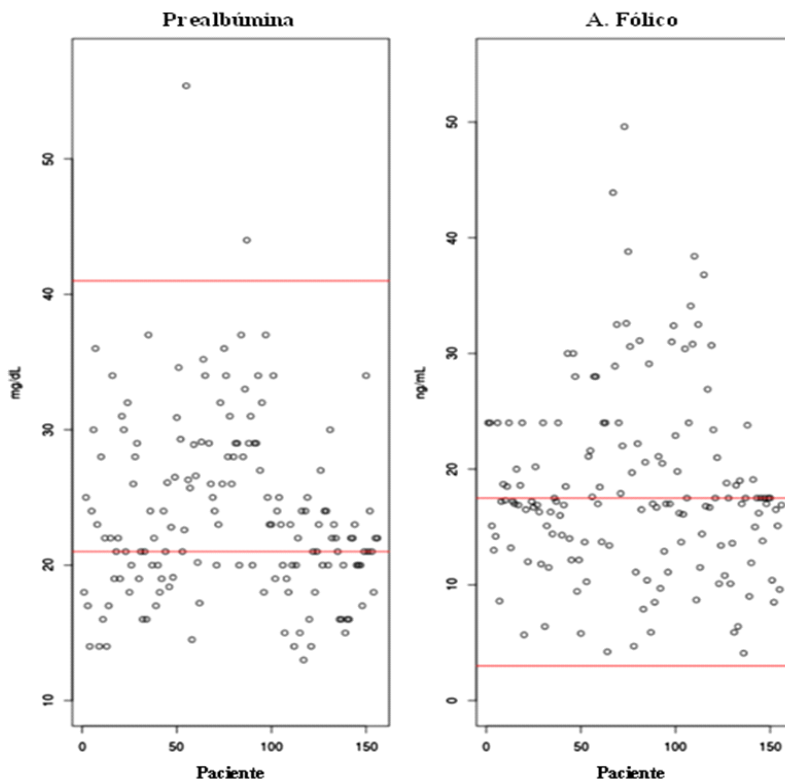
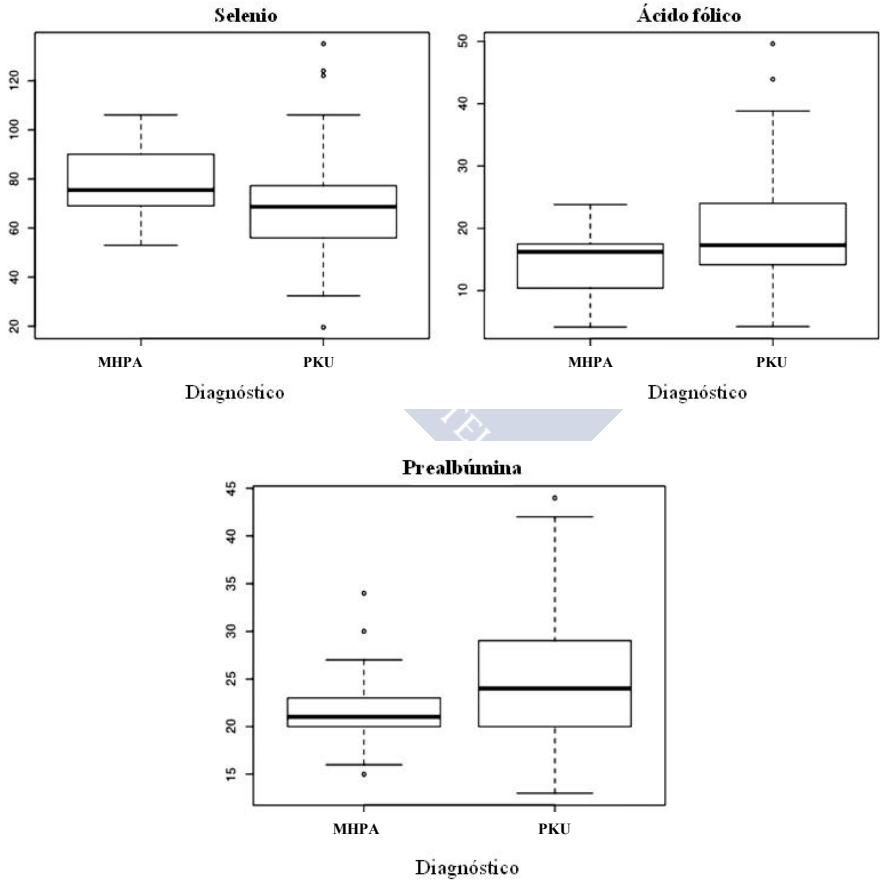


Figura 29: Distribución de los valores detectados en los 156 pacientes para los 4 parámetros más alterados del estudio (selenio, ácido fólico, prealbúmina y 25-hidroxi vitamina D)

A continuación, podemos ver las diferencias estadísticamente significativas observadas entre los dos fenotipos principales (MHPA frente a PKU). En tres de los marcadores evaluados (Palb, ferritina y ácido fólico), observamos que las concentraciones estaban significativamente más disminuidas en los pacientes MHPA con respecto a los PKU (ferritina: 28,4 vs 49,6 ng/mL; $p=0.0084$; Palb: 21,2 vs 24,5 mg/L, $p=0.024$; ácido fólico: 14,3 vs 23,4 ng/mL, $p=0.0147$). Por el contrario, los niveles de Se y P en sangre eran significativamente menores en PKU frente a MHPA (Se: 67,9 vs 78,3 ng/mL, $p=0.003$; P: 4,2 vs 4,7 mg/dL, $p=0.005$) aunque en el caso de P solo cinco pacientes presentaban valores inferiores al límite normal (Tabla 10 y Figura 30).

	MHPA		PKU		P-valor
	Media	DE	Media	DE	
Prealbúmina (mg/dL)	21,2	4,29	24,5	6,57	0,024
Ferritina (ng/mL)	28,4	17,8	49,6	46,8	0,008
Ácido fólico (ng/mL)	14,3	8,35	23,4	43,1	0,014
Selenio (ng/mL)	67,9	17,8	78,3	14,2	0,003
Fósforo (mg/dL)	4,2	0,56	4,7	1,22	0,005

Tabla 10: Niveles de micronutrientes en pacientes con MHPA y PKU. Parámetros con diferencias estadísticamente significativas entre la tolerancia de Phe .



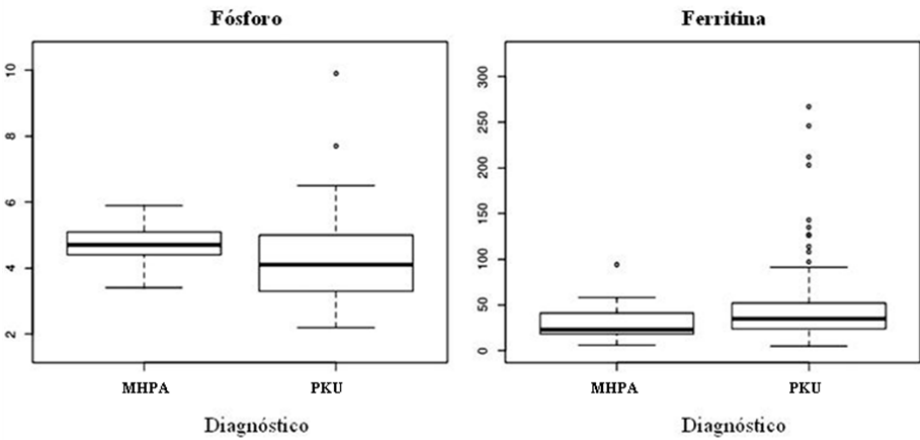


Figura 30: Diagrama de caja de los parámetros con diferencias significativas (selenio, ácido fólico, prealbúmina, fósforo y ferritina) en los pacientes según el fenotipo de la PKU (MHPA frente a PKU). El eje X indica los fenotipos MHPA y PKU. Los diagramas de caja muestran los valores medios (línea horizontal sólida); Percentiles 25 y 75 (caja); valores mínimos y máximos (barras); valores atípicos (círculos abiertos).

Si lo comparamos con los pacientes con CPKU, es decir agrupamos pacientes con MHPA y MPKU y lo comparamos con CPKU, también encontramos diferencias estadísticas significativas para B12 (587,6 vs 739,6 pg/mL; $p=0,004$) y para Zn (81,3 vs 88,9 $\mu\text{g/dl}$; $p=0,03$). No se encontraron diferencias con respecto al resto de micronutrientes y proteínas (Tabla 11 y Figura 31).

	MHPA-MPKU		CPKU		P-valor
	Media	DE	MEDIA	DE	
Vitamina B12 (pg/mL)	587,6	184,4	739,6	375,2	0,004
Zn ($\mu\text{g/dl}$)	81,3	16,26	88,9	21,5	0,03

Tabla 11: Niveles de vitamina B12 y Zn en pacientes con MHPA-MPKU y CPKU.

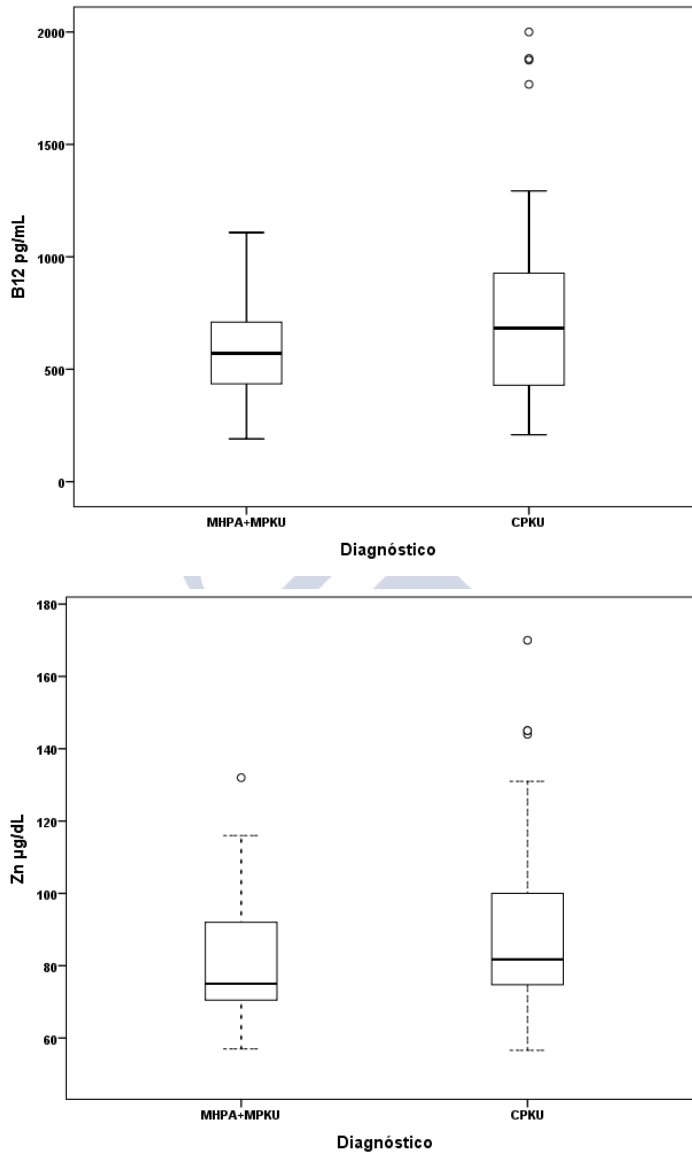
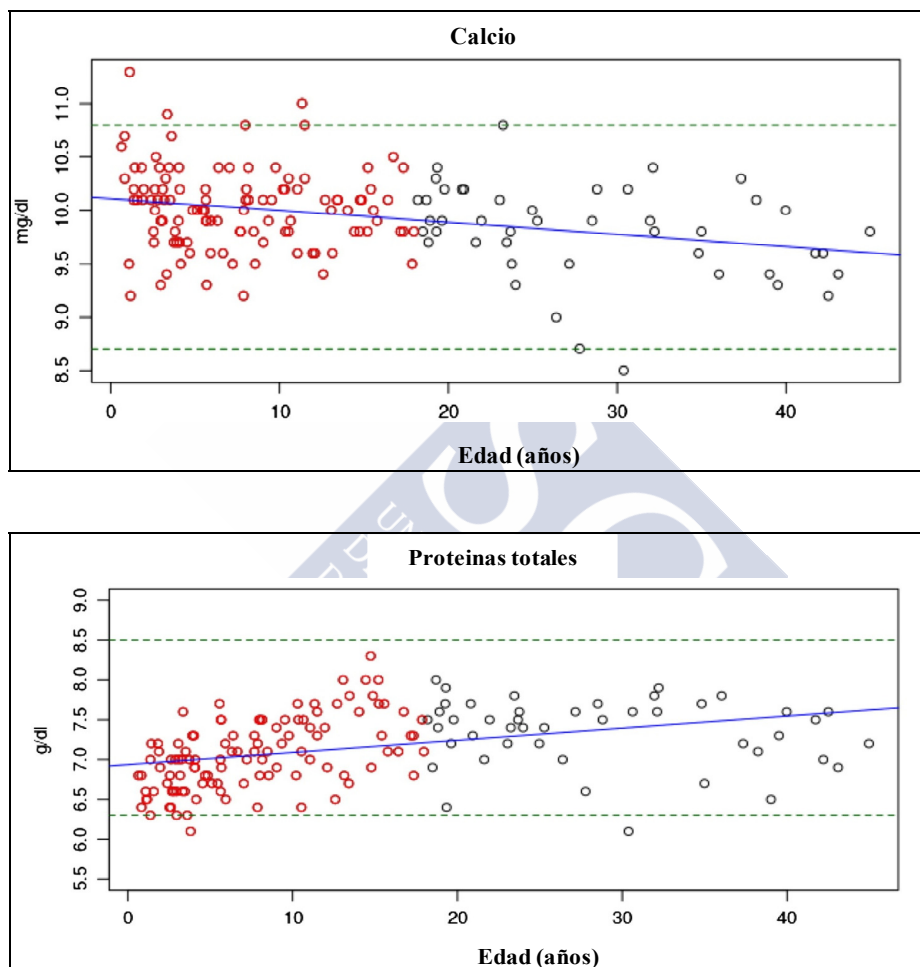


Figura 31: Diagrama de caja de los niveles de Vitamina B₁₂ y Zinc según el fenotipo de fenilketonuria MHPA-MPKU y CPKU. El eje X indica los fenotipos MHPA+MPKU y CPKU. Los diagramas de caja muestran los valores medios (línea horizontal sólida); Percentiles 25 y 75 (caja); valores mínimos y máximos (barras); valores atípicos (círculos abiertos).

Si tenemos en cuenta la edad se observó una correlación positiva con las PT, Palb y una correlación negativa con el Ca y P. Además, si categorizamos la población entre

pediátrica (<18 años) y adulta (>18 años), los pacientes pediátricos presentaban unos niveles de PT y Palb menores que los adultos (PT 7,05 vs 7,35 g/dL; $p=0,002$ y Palb 21,9 vs 28,5 mg/dL; $p<0,001$), en cambio el Ca y el P era menor en los pacientes adultos (Ca 10,1 vs 9,8 mg / dL; $p=0,015$ y P 4,7 vs 3,3 ng /mL; $p<0,001$). (Figura 32).



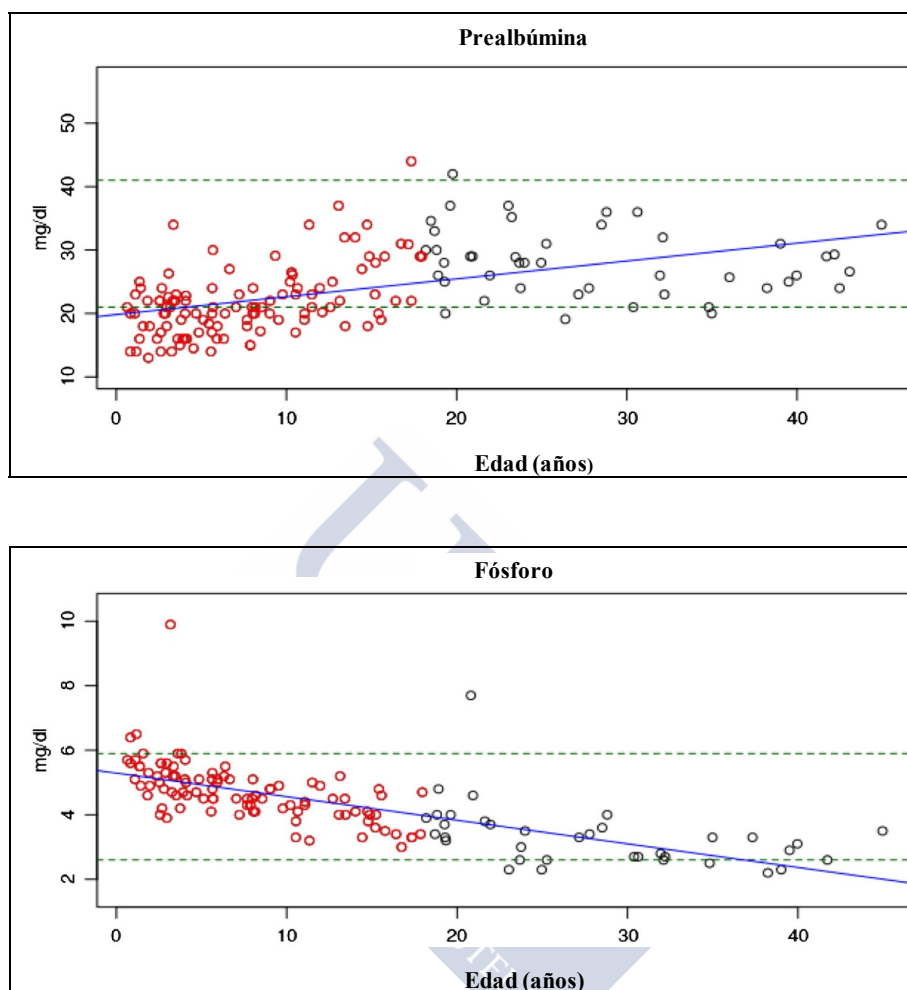
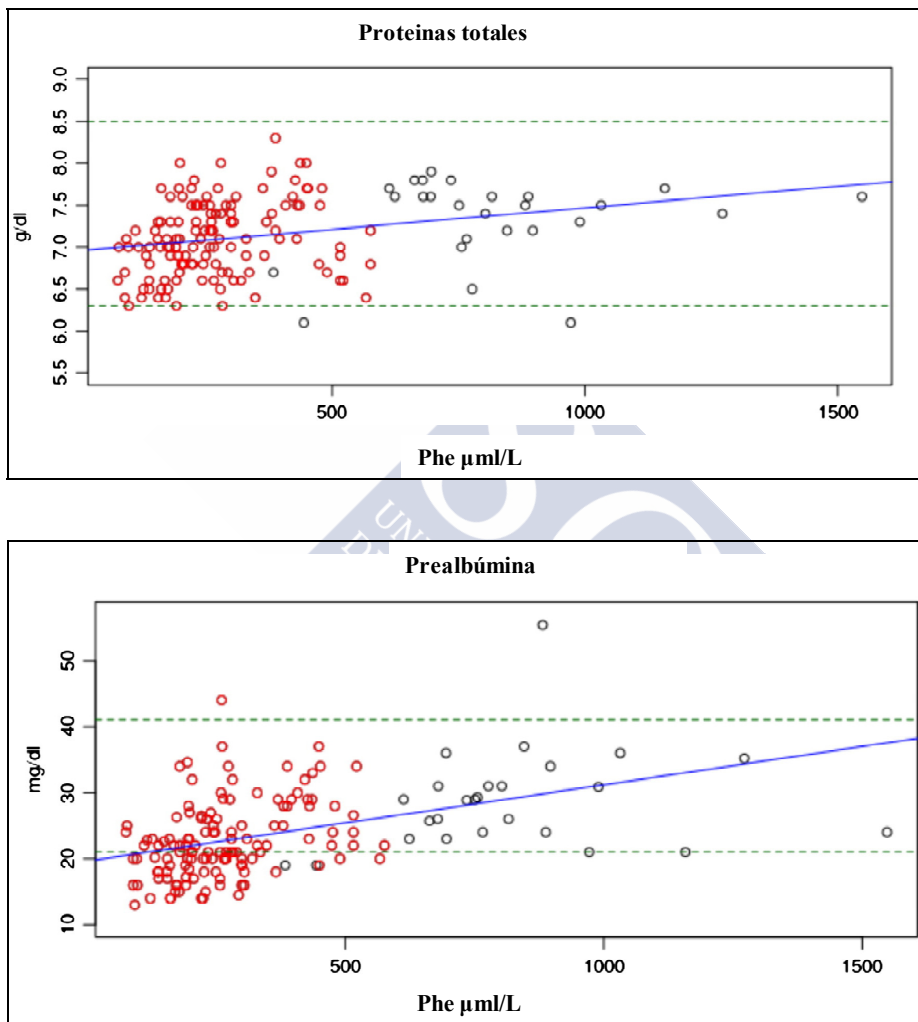


Figura 32: Parámetros (proteínas totales, prealbúmina, Calcio y fósforo) con correlación estadísticamente significativa según la edad del paciente (población pediátrica <18 años y adulta >18 años. En rojo los pacientes <18 años y en negro los pacientes >18 años.

Si tenemos en cuenta la mediana de Phe como medida para monitorizar la adherencia a la dieta, observamos una correlación positiva con las PT, la Palb y una correlación negativa con la vitamina B12 y el P, estadísticamente significativa. No encontramos relación con el resto de parámetros evaluados (Figura 33).

Además si categorizamos a los pacientes según la adherencia a la dieta observamos que las concentraciones de PT y Palb fueron más bajas en los pacientes con una alta

adherencia a la dieta con respecto a los pacientes con baja adherencia (PT: 7,1 vs 7,3 g/dL, $p<0,001$; Palb: 22,6 frente a 29 mg/dL, $p<0,001$). Por el contrario los niveles de P y B₁₂ estaban más reducidos en los pacientes con baja adherencia a la dieta (P: 3,3 vs 4,5 mg / dL, $p<0,001$; vit B₁₂: 628 vs 679 pg / ml, $p=0,03$ (Figura 32).



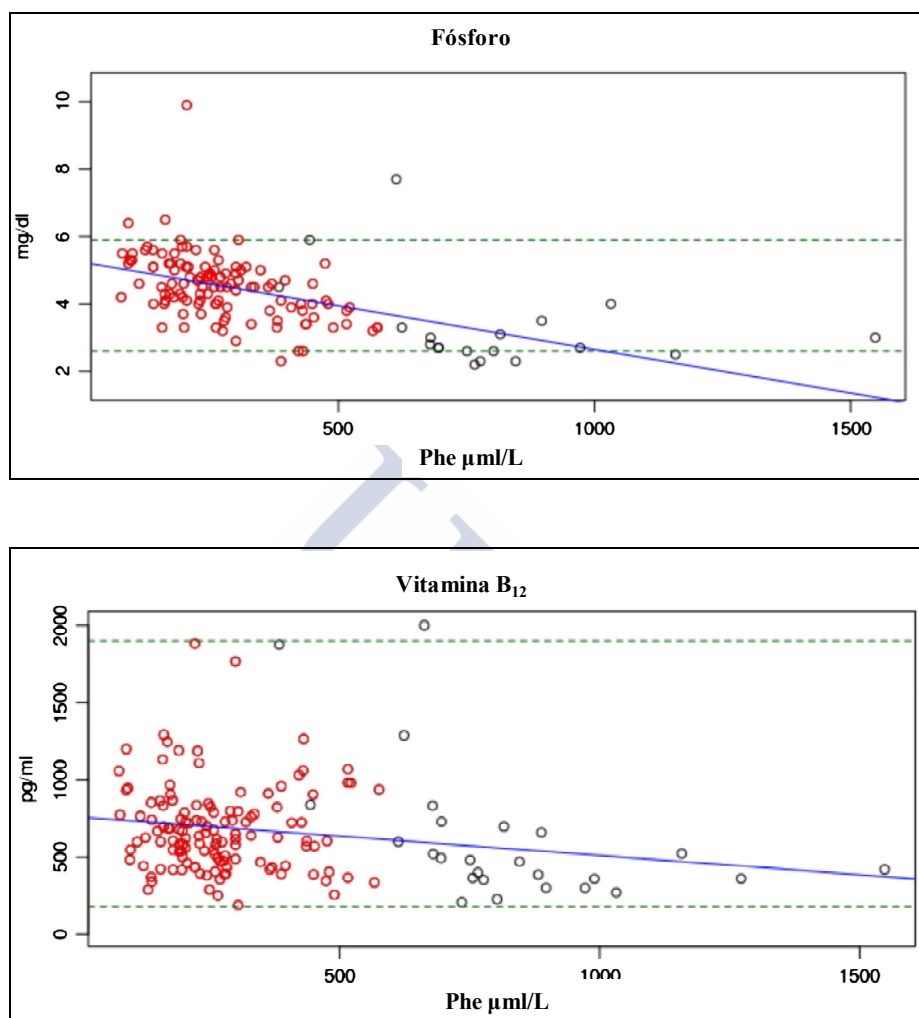


Figura 33: Parámetros bioquímicos (proteínas totales, prealbúmina, fósforo y vitamina B₁₂) con correlación estadísticamente significativa con los niveles de Phe (mediana en el último año). Phe:fenilalanina. En rojo los pacientes con alta adherencia a la dieta y en negro los pacientes con baja adherencia

El grupo de pacientes en los que se suma baja adherencia a la dieta y ser mayores de 18 años presentaron los 4 marcadores comentados previamente aún más alterados (PT 7,41 frente a 7,09 g/dL; $p=0,001$; Palb: 28,9 vs 22,8 mg/dL; $p<0,001$; P: 3,12 vs 4,51 mg / dL; $p<0,001$; B12: 563 vs 688 pg / mL; $p=0,009$).

Los pacientes que reciben tratamiento con BH4 y por tanto, menor restricción de proteínas naturales, presentaron niveles más bajos de B₁₂ que los no tratados (536 vs 694 pg/mL; $p < 0,001$). Ningún otro paciente con BH4 presentó alteraciones significativas de otros parámetros bioquímicos con respecto a los pacientes que no reciben tratamiento (Tabla 12).

	Terapia con restricción dietética		Terapia con restricción dietética moderada + BH4		
Micronutriente	Media	DE	Media	DE	p-valor
Calcio (mg/dL)	9,94	0,44	10,0	0,35	0,406
Fósforo (mg/dL)	4,22	1,26	4,08	0,71	0,621
Ferritina (ng/mL)	47,0	45,1	40,6	39,2	0,543
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	694,0	362,9	536,3	180,1	<0,001
Fólico (ng/mL)	20,2	8,47	16,6	8,10	0,070
Zinc (µg/dL)	88,1	20,5	80,6	13,5	0,095
Selenio (µg/dL)	66,6	18,6	74,0	11,1	0,070
25-OH vitD (ng/mL)	29,1	7,86	29,2	8,0	0,995
Proteínas totales (g/dL)	7,14	0,50	7,20	0,40	0,584
Prealbúmina (mg/dL)	24,2	6,53	25,6	6,58	0,338

Tabla 12: Niveles de micronutrientes en pacientes según reciban tratamiento con restricción dietética o tratamiento con dieta y BH4. DE: desviación estándar.

En el caso del momento del diagnóstico si se objetivaron diferencias entre los niveles de P, ácido fólico, Palb y PT en relación al momento del diagnóstico (diagnóstico temprano versus tardío), a pesar de que no tiene por qué influir en el estado nutricional no podemos sacar conclusiones teniendo en cuenta que el número de pacientes con diagnóstico tardío es pequeño ($n=18$) (Tabla 13).

Micronutriente	Diagnóstico Temprano		Diagnóstico Tardío		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
Calcio (mg/dL)	10,0	0,43	9,82	0,42	0,191
Fósforo (mg/dL)	4,41	1,06	3,28	0,64	<0,001
Ferritina (ng/mL)	42,7	41,9	31,6	21,7	0,315
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	652,3	288,8	765,8	507,9	0,176
Fólico (ng/mL)	17,8	7,57	25,7	11,6	<0,001
Zinc (µg/dL)	85,9	19,4	80,0	14,6	0,247
Selenio (µg/dL)	70,1	17,0	70,5	19,4	0,922
25-OH vitD (ng/mL)	28,6	7,96	25,2	6,51	0,098
Prealbúmina (mg/dL)	23,4	6,34	27,1	3,77	0,023
Proteínas totales (g/dL)	7,10	0,46	7,49	0,34	0,001

Tabla 13: Niveles de micronutrientes en pacientes según el momento de diagnóstico (temprano vs tardío).

5.2 EVALUACIÓN DE LA RIGIDEZ ARTERIAL MEDIANTE TONOMETRÍA POR APLANAMIENTO EN PACIENTES CON FENILCETONURIA.

5.2.1 Características de los sujetos:

Durante el período de estudio fueron evaluados 82 sujetos de entre 6 a 50 años, con una edad media de $21,7 \pm 11,8$ años. El 73,2% eran mujeres y 26,8 % hombres. (Figura 34). De ellos, 41 (50,0%) eran pacientes diagnosticados de PKU, de los cuales el 53,6% (22) presentaban CPKU y 46,3% (19) MPKU (Figura 35). Los otros 41 eran sujetos que acudían a otras consultas o a realizar análisis preoperatorio de problemas menores y fueron incluidos en el grupo control.

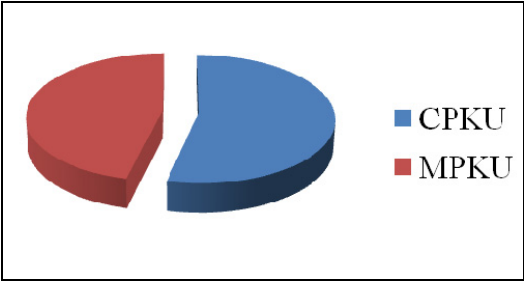


Figura 34: Clasificación según sexo de la muestra de los sujetos del estudio.

Como se diseñó previamente, no hubo diferencias significativas entre los pacientes con PKU y sus controles emparejados con respecto a la edad y al sexo (Tabla 14).

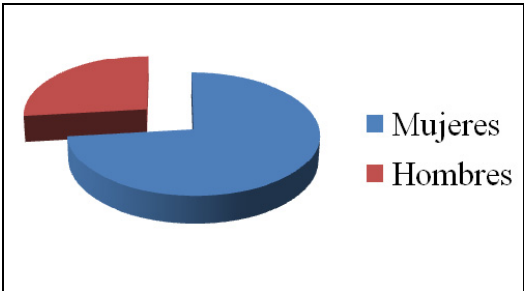


Figura 35: Clasificación por fenotipo de los pacientes.

	Sujetos PKU (n=41)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
Edad	23,2	21,8	20,3	10,7	0,437
Sexo (% hombres)	26,8	-	26,83	-	1.00

Tabla 14: Edad y sexo de los pacientes y controles. PKU: fenilcetonuria, DE: desviación estándar.

El 82,9% del total de los casos (34/41) presentaban unos niveles de Phe en sangre en los últimos 12 meses dentro de los niveles recomendados para su edad, por lo tanto tenían un control metabólico adecuado, siendo todos ellos menores de 18 años.

El 17,1% de los pacientes evaluados recibían tratamiento con BH4 (Figura 36) Ninguno de los pacientes tratados con BH4 tuvo niveles de Phe superiores al límite recomendado para su edad.

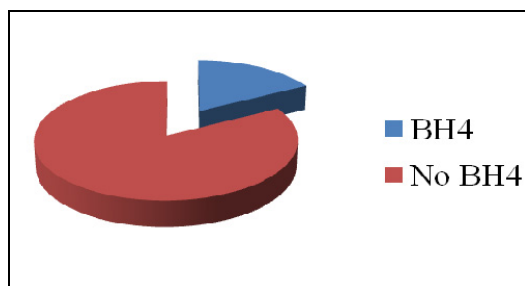


Figura 36: Clasificación según recibían o no tratamiento con BH4.

EDAD	Fenotipo	Alelo 1	Alelo 2	Mediana Phe mg/dL	Tratamiento
44	CPKU	p.R261Q c.782G>A	p.R261Q c.782G>A	15,87	Dieta
50	CPKU	p.R261Q c.782G>A	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	23,26	Dieta
41	CPKU	p.R408w c.12222C>T	ND	10,00	Dieta
8	CPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.R270K c.809G>A	5,30	Dieta
13	CPKU	p.V388M c.1162G>A	p.E280K c.838G>A	8,30	Dieta
33	CPKU	ND	ND	13,99	Dieta
33	CPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.R243Q c.728G>A	6,40	Dieta
14	CPKU	p.R261Q c.782G>A	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	8,90	Dieta
34	CPKU	IVS12ds c.1315+1G>A	p.A300S c.898G>T	6,30	Dieta
33	CPKU	p.R261Q c.782G>A	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	11,20	Dieta
16	CPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	9,60	Dieta
15	CPKU	p.R243X c.727C>T	p.V388M c.1162G>A	2,00	Dieta
28	CPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.I65T c.194T>C	8,40	Dieta
21	CPKU	p.E280K c.838G>A	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	12,98	Dieta
14	CPKU	p.R261Q c.782G>A	p.R176X c.526C>T	12,90	Dieta
22	CPKU	p.E280K c.838G>A	p.R261Q c.782G>A	9,19	Dieta
46	CPKU	p.E280K c.838G>A	p.E280K c.838G>A	10,50	Dieta
28	CPKU	p.V388M c.1162G>A	p. E280K c.838G>A	8,20	Dieta

EDAD	Fenotipo	Alcilo 1	Alcilo 2	Mediana Phe mg/dL	Tratamiento
40	CPKU	p.I65T c.194T>C	p.R261Q c.782G>A	7,29	Dieta
17	CPKU	ND	ND	15,40	Dieta
16	CPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.R243X c.727C>T	7,49	Dieta
16	CPKU	p.I65T c.194T>C	p.R243X c.727C>T	2,98	BH4 + Dieta
29	MPKU	p.V388M c.1162G>A	p.L48S c.143T>C	8,80	Dieta
17	MPKU	p.V230I c.688G>A	p.Y198fs c.593 614del22	3,00	Dieta
19	MPKU	p.R158Q c.473G>A	p.L48S c.143T>C	12,50	Dieta
46	MPKU	ND	ND	4,60	Dieta
20	MPKU	EX5del c.442-? 509+?del	p.A313V c.727C>T	1,80	Dieta
10	MPKU	p.E280K c.838G>A	p.T380M c.1139C>T	3,50	Dieta
12	MPKU	p.F55fs c.165delT	p.R261Q c.782G>A	6,80	Dieta
8	MPKU	p.F55fs c.165delT	p.K42E c.124A>G	2,48	Dieta
10	MPKU	p.A300S c.898G>T	A300S c.898G>T	2,60	Dieta
43	MPKU	p.E280K c.838G>A	p.E280K c.838G>A	11,80	Dieta
40	MPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.R261Q c.782G>A	15,20	Dieta
11	MPKU	p.A403V c.1208C>T	p.Y417H c.1249T>C	2,65	Dieta
11	MPKU	p.V388M c.1162 G>A	p.R176Q c.527G>A	3,05	Dieta
17	MPKU	p.R243Q c.728G>A	p.E390G c.1169A>G	5,14	BH4 + Dieta
21	MPKU	p.P244L c.728C>T	p.R261Q c.782G>A	4,40	BH4 + Dieta
11	MPKU	p.E280K c.838G>A	p.T380M c.1139C>T	3,60	BH4 + Dieta
7	MPKU	IVS10nt-11G>A c.1066-11G>A	p.R68S c.204A>T	6,96	BH4 + Dieta
9	MPKU	p.L48S c.143C>T	p.Y277D c.754C>T	1,90	BH4 + Dieta
9	MPKU	p.L48S c.143C>T	p.Y277D c.754C>T	2,55	BH4 + Dieta

Tabla 15: Edad, fenotipo, genética según secuencia de referencia NM_000277.1, mediana de Phe el último año, tratamiento. MPKU: fenilketonuria leve-moderada, CPKU: fenilketonuria clásica.

5.2.2 Antropometría y perfil lipídico

En relación a las medidas antropométricas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en peso, talla y circunferencia de cintura. Sin embargo, el porcentaje de sobrepeso/obesidad según el IMC fue ligeramente superior en pacientes PKU que en los controles (43,9% vs 39,5%, $p=0,823$). De los pacientes PKU con un IMC inadecuado el 61,1% presentaban sobrepeso y 38,9% obesidad. En el caso de los controles 52,9% de ellos tenían sobrepeso y 47,1% obesidad (Figura 37). Sin embargo, el porcentaje de sujetos con obesidad central, determinada por perímetro de cintura superior al límite recomendado, era mayor, aunque no significativo en los pacientes fenilcetonúricos (46,34% vs 27,9%, $p=0,074$). Ningún sujeto del estudio, tanto casos como controles, presentó un peso por debajo de lo normal (Tabla 16).

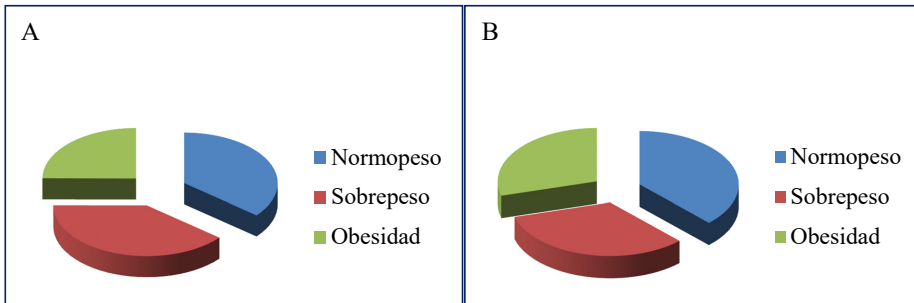


Figura 37: Clasificación según Índice de masa corporal (A) Casos, (B) Controles.

	Sujetos PKU (n=41)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
Peso (kg)	60,5	19,2	55,4	23,5	0,501
Talla (cm)	156,0	11,1	155,0	16,0	0,826
CC (cm)	76,5	18,2	72,4	15,7	0,470
IMC (kg/m²)	24,4	6,22	22,3	7,1	0,387

Tabla 16: Valoración antropométrica en los pacientes y controles a estudio. CC: Circunferencia cintura. IMC: índice de masa corporal, DE: desviación estándar.

Teniendo en cuenta el tratamiento que recibían los sujetos con PKU se observó que los pacientes con menor tolerancia de Phe (n: 21, 51,2%) y por tanto una mayor restricción de proteínas naturales, mostraron más peso corporal (67,6 kg vs 52,8 kg; $p=0,012$), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al IMC y el perímetro de cintura (Tabla 17).

	Tolerancia Phe >500 mg/día		Tolerancia Phe <500 mg/día		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
Peso (kg)	67,6	17,4	52,9	18,3	0,012
IMC (kg/m²)	26,2	6,6	22,5	5,2	0,05
CC (cm)	79,3	22,4	73,9	12,9	0,24

Tabla 17: Valoración antropométrica según la tolerancia de fenilalanina en los pacientes con PKU. Phe: fenilalanina, CC: Circunferencia cintura, IMC: Índice de masa corporal, DE: desviación estándar.

En la misma línea, aquellos pacientes con PKU bajo tratamiento con BH4 mostraron un IMC más bajo que aquellos que sólo recibían restricción dietética (20,4 vs 25,18 kg/m²; $p=0,037$). En este caso no hubo diferencias significativas en relación con el peso y el perímetro de cintura (Tabla 18).

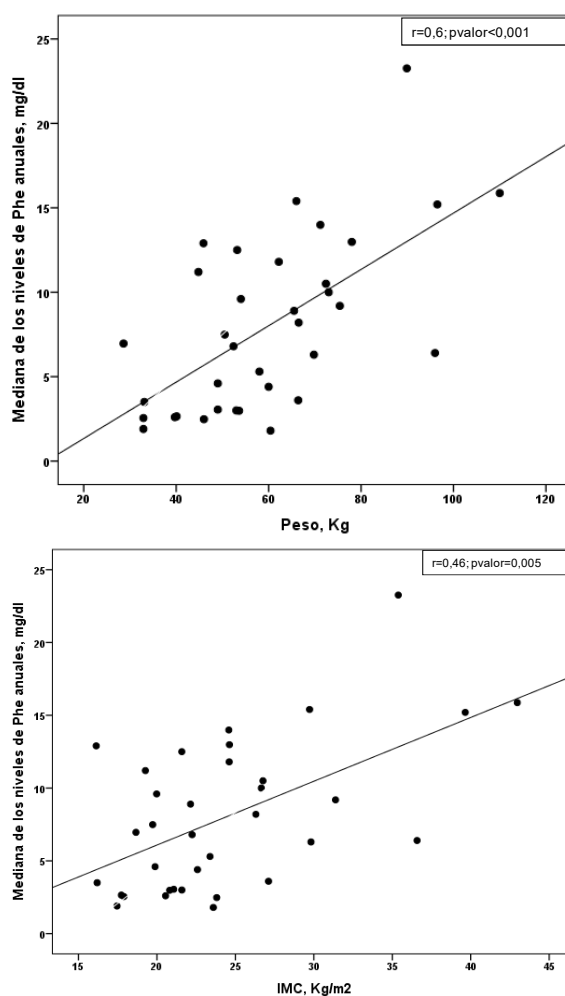
	Terapia con restricción dietética		Terapia con restricción dietética moderada + BH4		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
Peso (kg)	6,36	18,5	44,9	14,95	0,017
IMC (kg/m²)	25,4	6,4	20,4	3,4	0,037
CC (cm)	78,1	18	69	13	0,145

Tabla 18: Valoración antropométrica en los pacientes con fenilketonuria según sean o no respondivos a BH4. CC: Circunferencia cintura. IMC: Índice de masa corporal

Si valoramos el control metabólico teniendo en cuenta la mediana de Phe del último año observamos una correlación lineal positiva entre los niveles de Phe y el peso, IMC y la CC estadísticamente significativa (Tabla 19, Figura 38).

		Mediana Phe (mg/dL)
Peso (kg)	r	0,6
	p valor	<0,001
IMC (kg/m ²)	r	0,462
	p valor	0,005
CC (cm)	r	0,384
	p valor	0,036

Tabla 19: Correlación lineal de la mediana de los niveles de fenilalanina anuales con los parámetros antropométricos valorados en los pacientes con PKU. CC: Circunferencia cintura. IMC: índice de masa corporal, Phe: fenilalanina.



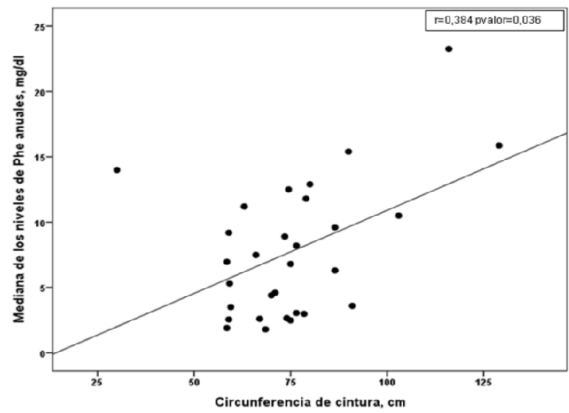


Figura 38: Correlación lineal de la mediana de los niveles de Phe anuales con el peso, IMC: índice de masa corporal y circunferencia de cintura.

Con respecto al perfil lipídico en sangre, los niveles de CT, HDL-C y LDL-C fueron menores en los pacientes con PKU que en los controles, aunque las diferencias no fueron significativas. No se encontraron diferencias al evaluar las concentraciones de triglicéridos. (Tabla 20).

	Sujetos PKU (n=41)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
CT (mg/dL)	160,5	35,6	174,3	33,4	0,468
LDL-C (mg/dL)	89,1	27,9	96,9	27,9	0,377
HDL-C (mg/dL)	53,4	13,5	57,5	16,7	0,476
TG (mg/dL)	91,9	52,5	86,7	46,3	0,978

Tabla 20: Valoración del perfil lipídico en los pacientes con PKU y controles. PKU: fenilcetonuria, CT: colesterol total, LDL-C: lipoproteína de baja densidad, HDL-C: lipoproteína de alta densidad, TG: triglicéridos.

5.2.3 Valoración del grado de rigidez arterial

Las propiedades elásticas de las grandes arterias se valoraron mediante la tonometría por aplanamiento. Comparando los controles frente a PKU los datos obtenidos de la medición de la tonometría por aplanamiento se reflejan en las tablas 21 y 22.

	Sujetos PKU (n=41)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
FC (lpm)	69,9	9,14	73,6	11,9	0,663
PAS (mm/Hg)	114,2	13,4	113,0	16,7	0,875
PAD (mm/Hg)	69,7	11,5	67,2	10,1	0,445
PASc (mm/Hg)	101,0	14,6	100,4	10,9	0,754
PADc (mm/Hg)	70,8	11,5	77,1	10,6	0,128
PPc (mm/Hg)	31,6	10,6	28,8	7,6	0,377

Tabla 21: Resultados de la tonometría por aplanamiento en PKU y controles. PKU: fenilcetonuria, DE desviación estándar, FC: frecuencia cardíaca, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PASc: presión arterial sistólica central, PADc: presión arterial diastólica central, PPC: presión de perfusión central

Los pacientes adultos y niños con PKU tenían una PAS y PAD similar a la de los controles, al igual que la frecuencia cardíaca, PASc, PADc y PPC (Tabla 21). Sin embargo, nuestro estudio pone de manifiesto una destacada elevación de AP, AIX, AIXHR75 y VOP en los pacientes con fenilcetonuria respecto a los controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 22). El porcentaje de pacientes con PKU con VOP por encima del percentil 90 fue mayor que el de los controles (14,63% frente al 2,32%, $p=0.048$) (Tabla 23).

	Sujetos PKU (n=41)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
AP (mmHg)	5,09	4,86	2,7	4,1	0,139
AIX (mmHg)	14,9	11,6	9,5	12,4	0,024
AIXHR75(%)	12,2	13,3	8,8	12,5	0,426
VOP (m/seg)	6,00	1,70	5,26	0,95	0,150

Tabla 22: Parámetros obtenidos por la medición mediante tonometría por aplanamiento en PKU y controles. PKU: fenilcetonuria, DE: desviación estándar, AP: incremento de presión, AIX: índice de aumento o de potenciación, AIXHR75: índice de aumento o de potenciación corregido para 75lpm, VOP: velocidad de onda de pulso.

Casos	VOP (m/seg)	Controles	VOP (m/seg)
1	11,30	1	4,50
2	10,20	2	5,50
3	4,30	3	5,30
4	9,20	4	4,70
5	5,90	5	5,50
6	7,80	6	6,00
7	4,10	7	4,40
8	5,20	8	6,10
9	7,40	9	6,00
10	7,20	10	6,10
11	5,60	11	4,10
12	8,40	12	6,20
13	5,60	13	6,00
14	5,70	14	6,60
15	5,70	15	5,40
16	4,30	16	7,30
17	4,70	17	4,00
18	5,70	18	6,20
19	5,70	19	5,50
20	4,90	20	4,10
21	4,70	21	4,80
22	4,60	22	5,50
23	4,80	23	7,00
24	6,30	24	6,80
25	5,20	25	6,50
26	5,20	26	5,10
27	4,70	27	4,50
28	4,30	28	4,80
29	6,40	29	4,60
30	7,70	30	4,50
31	6,70	31	4,20
32	6,60	32	4,20
33	8,60	33	4,00
34	7,10	34	4,40
35	4,40	35	5,10
36	4,30	36	4,50
37	5,90	37	4,50
38	5,80	38	4,50
39	4,30	39	4,50
40	4,70	40	5,40
41	4,90	41	7,10

Tabla 23: Velocidad de onda de pulso en fenilcetonuria (casos) y controles. En azul son aquellos sujetos con velocidad de onda de pulso > p90 según los valores de referencia. VOP: velocidad de onda de pulso.

Con respecto al fenotipo de PKU, en un análisis multivariante no hallamos diferencias en PAsC, PADc, AP, Aix@HR75 entre los controles, MPKU y CPKU (Tabla 24). No obstante, se observó mayor VOP en pacientes CPKU respecto a aquellos con MPKU (6,60 vs 5,30m/seg; $p=0,07$) y a los controles (6,60 vs 5,26 m/seg, $p=0,044$) (Figura 39).

	CPKU (n=22)		MPKU (n=19)		Controles (n=41)		p-valor
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
PASc (mmHg)	106,2	15,5	95,1	11,2	100,4	10,9	0,05
PADc (mmHg)	75,9	11,1	65,0	9,24	77,1	10,6	0,002
AP (mmHg)	5,77	4,9	4,3	4,6	2,7	4,11	0,25
AIXHR75 (%)	13,9	13,9	10,1	12,5	8,8	12,5	0,42

Tabla 24: Parámetros obtenidos por la medición mediante tonometría por aplanamiento en CPKU: fenilcetonuria clásica, MPKU: fenilcetonuria leve-moderada y controles. PAsC: presión arterial sistólica central, PADc: presión arterial diastólica central, AP: incremento de presión, AIXHR75: índice de aumento o de potenciación corregido para 75lmp), DE: desviación estándar.

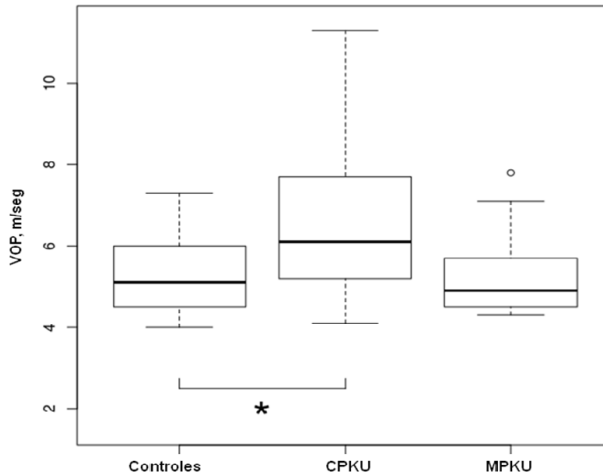


Figura 39: Diagrama de caja de la VOP según el fenotipo de fenilcetonuria. El eje X indica los controles, MPKU: fenilcetonuria leve-moderada y CPKU: fenilcetonuria clásica. Los diagramas de caja muestran los valores medios (línea horizontal sólida); Percentiles 25 y 75 (caja); valores mínimos y máximos (barras); valores atípicos (círculos abiertos). El * * indica las diferencias estadísticamente significativas: $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta el grado de control metabólico se evidencia una correlación lineal estadísticamente significativa entre la media anual de Phe y VOP en los pacientes con PKU ($r=0,496$; $p=0,012$). (Figura 40). También pudimos observar una correlación lineal entre media anual de Phe y el AIXHR75, no siendo en este caso estadísticamente significativo ($r=0,302$, $p=0,075$) (Figura 41).

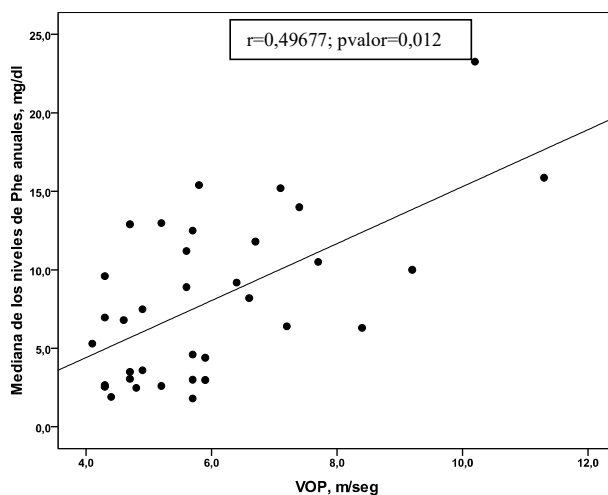


Figura 40: Correlación lineal entre la velocidad de onda de pulso (VOP) y el control metabólico de los pacientes.

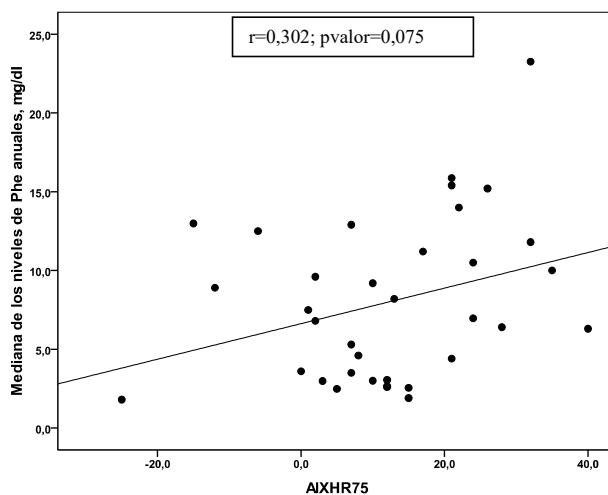


Figura 41: Correlación lineal entre el índice de aumento (AIXHR75) y el control metabólico de los pacientes.

En relación con el tratamiento los sujetos con PKU con menor tolerancia de Phe (n: 21, 51,2%) mostraron una VOP mayor que aquellos con mayor tolerancia de Phe y por tanto menor restricción dietética (6,55 m/seg vs 5,42 m/seg; $p=0,044$) (Tabla 25). Además, los pacientes tratados con sapropterina muestran una velocidad de la onda de pulso menor que aquellos pacientes con tratamiento exclusivamente dietético (VOP: 4,85 m/seg vs 6,23m/seg, $p=0,034$) (Tabla 26).

	Tolerancia Phe <500 mg/día		Tolerancia Phe >500 mg/día		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
VOP (m/seg)	6,55	1,98	5,42	1,13	0,044

Tabla 25: Velocidad de onda de pulso (VOP) según la tolerancia de Phe. DE: desviación estándar.

	Terapia con restricción dietética		Terapia con restricción dietética moderada + BH4		p-valor
	Media	DE	Media	DE	
VOP (m/seg)	6,23	1,75	4,85	0,74	0,034

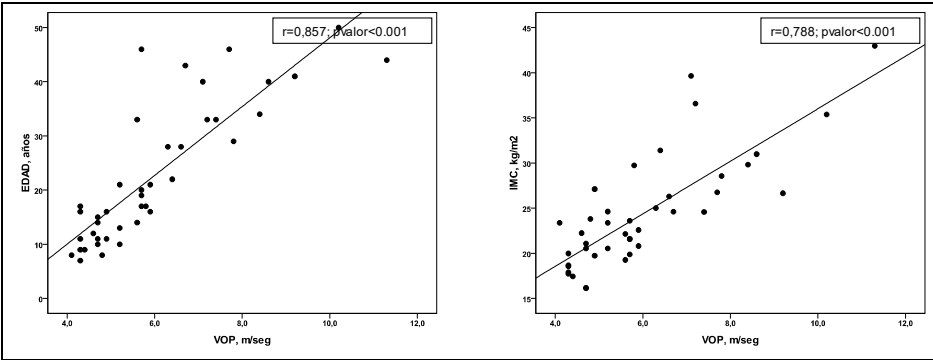
Tabla 26: Velocidad de onda de pulso (VOP) en pacientes que reciben BH4 con restricción dietética moderada y aquellos en los que sólo reciben restricción dietética. DE: desviación estándar.

Además, en nuestro estudio observamos una correlación lineal estadísticamente significativa entre la VOP y la edad, el peso, el IMC, la circunferencia de cintura, PASc, PADc y AIXHR75 en los pacientes con PKU leve-moderada y clásica (Tabla 27 y Figura 42).

En relación con el AIXHR75 también observamos una correlación lineal estadísticamente significativa entre el AIXHR75 en pacientes PKU y la edad, PASc, PADc y la VOP como comentamos previamente (Tabla 27 y Figura 43).

		AIXHR75	VOP
Edad (años)	r	0,497	0,857
	p valor	0,001	<0,001
Peso (kg)	r	0,270	0,803
	p valor	0,087	<0,001
IMC (kg/m ²)	r	0,369	0,788
	p valor	0,018	<0,001
C.C (cm)	r	0,102	0,488
	p valor	0,564	0,003
PASc (mm/Hg)	r	0,611	0,808
	p valor	0,001	<0,001
PADc (mm/Hg)	r	0,458	0,739
	p valor	0,003	<0,001
AIXHR75 (%)	r		0,502
	p valor		0,001

Tabla 27: Correlaciones entre la edad, mediciones antropométricas, mediciones de presión arterial central y la velocidad de la onda pulso (VOP) y el índice de aumento (AIXHR75) en pacientes con fenilketonuria leve-moderada y clásica. IMC: índice de masa muscular, CC: circunferencia cintura, PASc: presión arterial sistólica central, PADc: presión arterial diastólica central, AIXHR75: índice de aumento o de potenciación corregido para 75Imp.



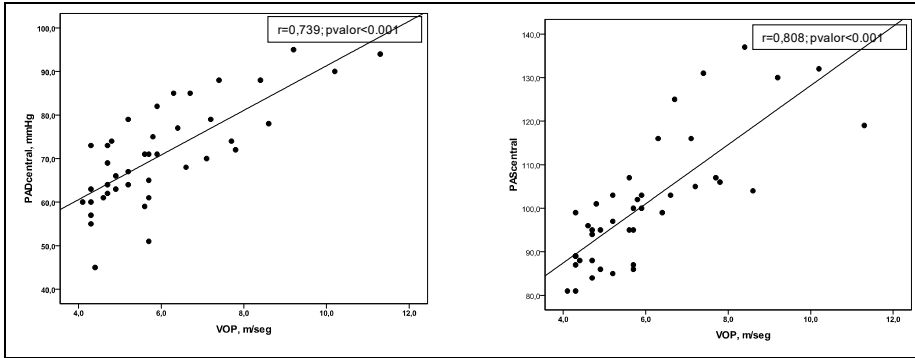


Figura 42: Correlaciones entre la edad, índice de masa muscular (IMC), presión arterial (PA) y la velocidad de la onda pulso de pulso (VOP) en pacientes con fenilcetonuria leve-moderada y clásica., PASc: presión arterial sistólica central, PADc: presión arterial diastólica central.

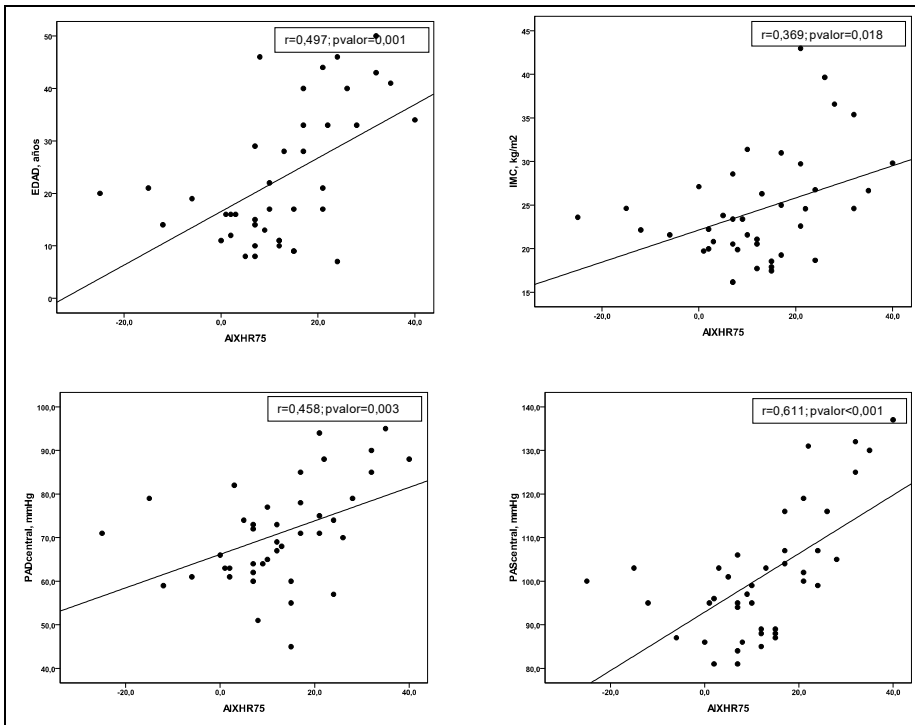


Figura 43: Correlaciones entre la edad, índice de masa muscular (IMC), presión arterial y el índice de potenciación (AIX) en pacientes con fenilcetonuria leve-moderada y clásica. PASc: presión arterial sistólica central, PADc presión diastólica central.

Con el fin de evaluar el modelo que permite predecir la variabilidad de la VOP se realizó un análisis de regresión lineal incluyendo como variables dependientes o predictoras las variables antropométricas, la edad, la PADc y la PAsC.

Mediante el análisis de regresión lineal univariante se observó que todas las variables dependientes presentaban una asociación estadísticamente significativa con la VOP (Tabla 28).

	β	p-valor
Edad (años)	0,11 \pm 0,01	<0,001
Peso (kg)	0,07 \pm 0,01	<0,001
IMC (kg/m²)	0,22 \pm 0,01	<0,001
CC (cm)	0,06 \pm 0,01	<0,001
PADc (mmHg)	0,11 \pm 0,01	<0,001
PASc (mmHg)	0,09 \pm 0,01	<0,001

Tabla 28: Modelo de regresión univariante para explicar la variabilidad de la velocidad de onda de pulso. β : coeficiente de regresión. IMC: Índice de masa muscular, CC: circunferencia cintura PADc: presión arterial diastólica central, PASc: presión arterial sistólica central,

Cuando se realizó un análisis de regresión múltiple incluyendo la edad, las variables antropométricas (IMC y CC) las principales variables predictoras de la VOP fueron la edad y el IMC, sin observar un efecto estadísticamente significativo ejercido por la CC (modelo 1, Tabla 29).

En cuanto al efecto de la PAC, observamos que, ajustando para la edad, sólo la PADc afecta a la VOP (modelo 2, Tabla 29).

Finalmente, el modelo construido con la edad, el IMC y la presión arterial, evidenció que los parámetros que explicaban mejor la VOP fueron la edad, el IMC y la PADc. (modelo 3 y modelo 4, Tabla 29) Este modelo es capaz de explicar el 85% de la variabilidad de la VOP con un p-valor<0,001.

Modelo1

	β	p-valor
Edad (años)	0,48	<0,001
IMC (kg/m2)	0,55	<0,001
CC (cm)	0,03	0,691
R2 ajustado	0,89	<0,001

Modelo 2

	β	p-valor
Edad (años)	0,56	<0,001
PADc (mmHg)	0,34	0,011
PASc (mm/Hg)	0,11	0,464
R2 ajustado	0,79	<0,001

Modelo 3

	β	p-valor
Edad (años)	0,42	<0,001
IMC (kg/m2)	0,33	<0,001
PADc (mm/Hg)	0,21	0,318
PASc (mm/Hg)	0,13	0,079
R2 ajustado	0,85	<0,001

Modelo 4

	β	p-valor
Edad (años)	0,47	<0,001
IMC (kg/m2)	0,32	<0,001
PADc (mm/Hg)	0,28	0,318
R2 ajustado	0,85	<0,001

Tabla 29: Modelo de regresión múltiple para explicar la variabilidad de la VOP. β : coeficiente de regresión. IMC: índice de masa corporal, CC: circunferencia de cintura, PADc: presión arterial diastólica central, PAsC: presión arterial sistólica central.



DISCUSIÓN





6 DISCUSIÓN

6.1 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MICRONUTRIENTES Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA.

Desde que en 1953 Bickel¹⁷ demostró que los pacientes con niveles elevados de Phe en sangre se beneficiaban de un tratamiento basado en una dieta restringida en Phe se ha conseguido evitar el deterioro neurológico y físico que presentaban los pacientes con PKU. Sin embargo, a pesar de realizar un adecuado cumplimiento dietético se han notificado deficiencias de varios micronutrientes en pacientes con PKU, entre los que destacan el déficit de Zn, Se, Fe, Ca, vitamina D, ácido fólico y vitamina B₁₂^{105-109, 122, 124, 207} pesar de ello sólo se han descrito manifestaciones clínicas en el caso de déficit de vitamina B₁₂^{115, 207}.

El objetivo del tratamiento dietético en pacientes con fenilcetonuria es mantener las concentraciones de Phe en plasma que permitan el crecimiento óptimo, el desarrollo y el funcionamiento mental al mismo tiempo que se proporciona una dieta nutricional completa⁷¹.

El tratamiento a base de una dieta restringida en proteínas naturales supone una importante carga económica y social a los pacientes y a sus familias, lo que a veces lleva a los pacientes a no adherirse adecuadamente a la dieta^{208, 209}, sobre todo hacia la edad adulta. Durante los primeros años de vida son los padres quienes controlan la alimentación y el cumplimiento dietético suele ser bueno, conforme van creciendo la adherencia a la dieta cada vez es más complicada e incluso puede producirse el abandono de la dieta con las consecuencias que eso conlleva (riesgo de disfunción cognitiva, problemas de comportamiento y déficits nutricionales^{94, 210}). Ahring *et al.*²¹¹ en una encuesta realizada a 10 centros europeos para comparar el control de Phe en sangre logrado en pacientes de diferentes grupos, tratados con dieta, concluyeron que, en promedio, solo en el 65% de las muestras de pacientes mayores de 16 años tenía un

buen control. En nuestro estudio pudimos observar un adecuado cumplimiento terapéutico en un porcentaje mayor de pacientes y al igual que en el estudio realizado por Ahring *et al.* objetivamos un peor control metabólico en los adultos.

La introducción del tratamiento con BH4 en aquellos pacientes respondedores ha permitido relajar la dieta, aumentando la ingesta de proteínas naturales y permitiendo disminuir o suprimir el aporte de suplementos de aminoácidos libres de Phe. Esto en si tiene doble vertiente, por un lado estos pacientes pueden recibir una dieta más variada y por tanto recibir el aporte de micronutrientes con mayor biodisponibilidad, sin embargo, en muchas ocasiones son sujetos con riesgo de desarrollar déficit nutricionales porque no recibe una dieta variada y además tampoco reciben la suplementación de micronutrientes a través de la fórmula de aminoácidos.

Por lo tanto, los pacientes con PKU pertenecen a un grupo de sujetos con riesgo de presentar alteraciones nutricionales y complicaciones secundarias como retraso de crecimiento, desarrollo precoz de osteoporosis u osteopenia y alteraciones psicosociales^{57, 212}. Así, el conseguir un adecuado control metabólico es todo un reto en estos pacientes. Son múltiples las causas que pueden originar alteraciones nutricionales⁵⁹.

En este trabajo se valoraron los niveles de vitaminas, minerales y otros parámetros bioquímicos que se encuentran con más frecuencia alterados en 156 pacientes con hiperfenilalaninemia (MHPA, MPKU y CPKU). Se pudo observar que más de las mitad de los pacientes presentaron marcadores bioquímicos fuera del rango recomendado, aunque este hallazgo sólo fue significativo en el caso de la Palb y Se.

Valorando los diferentes fenotipos de PKU, observamos que era más frecuente encontrar alteraciones en pacientes con CPKU que con MPKU y MHPA, lo que parece estar en relación a la dieta que reciben, dado que los pacientes con CPKU precisan mayor restricción de proteína de alto valor biológico.

Curiosamente, de los pacientes que tenían algún parámetro bioquímico alterado un porcentaje elevado de sujetos presentaba una adecuada adherencia a la dieta.

La Phe es un aminoácido aromático indispensable, necesario para la síntesis de proteínas, el resto de Phe que no es empleado en la síntesis es hidroxilado a tirosina. En pacientes con PKU grave se mantiene una capacidad mínima o insignificante para oxidar la Phe a tirosina⁵⁹. La tolerancia de Phe que se corresponde con la ingesta diaria de Phe que un sujeto puede consumir sin que aumente la cifra de Phe en sangre por encima del rango superior que se considera objetivo de tratamiento⁵⁹, es un parámetro que permite clasificar los diversos fenotipos de HPA⁴⁵. En pacientes con CPKU, la tolerancia natural a las proteínas suele ser equivalente a menos de 10g de proteína natural al día (500 mg/día de Phe) aunque ésta puede variar según la edad, tasa de crecimiento, género, tasa de hidroxilación de Phe, dosificación de suplementos de AA libre de Phe, tratamiento con BH4^{59, 105}. Su dieta consiste principalmente en alimentos con proteínas de bajo valor biológico como frutas, verduras y algunos cereales, suplementada con fórmulas de aminoácidos exentes de Phe y alimentos especiales que contienen niveles bajos de Phe, que permitan el aporte de Phe suficiente para un correcto crecimiento⁵⁷. Esta estrategia implica la suplementación, con vitaminas y minerales de las fórmulas de los suplementos de aminoácidos libres de Phe, particularmente cuando la ingesta de proteínas de origen natural es muy baja y el mayor porcentaje de proteínas lo aporta la fórmula de aminoácidos libre de Phe.

El número y variedad de suplementos de aminoácidos aumenta constantemente. Se desconoce el perfil idóneo de micronutrientes¹⁰⁸. Existen más de 20 mezclas a nivel mundial con un amplio rango de diferencias en la composición de macronutrientes y micronutrientes. La constante es la ausencia de Phe con una variabilidad en la presencia o ausencia de vitaminas, minerales, lípidos e hidratos de carbono, así como variación también en la cantidad⁵⁶.

La mejoría en la palatabilidad, la presentación y la composición nutricional de los suplementos proteicos han ayudado a mejorar el cumplimiento del tratamiento, sin embargo aún hay amplio camino para mejorar en esta área⁵⁷.

En nuestro estudio se calculó la ingesta de nutrientes que recibía cada paciente, comprobando que los del fenotipo clásico toleran generalmente entre 350 y 400mg de fenilalanina al día o incluso menos, y al determinar la mediana de Phe en sangre en el último año como medida de cumplimiento dietético²⁰⁰ un porcentaje elevado de pacientes como hemos comentado previamente, la tenía en rango normal. De hecho, y debido con seguridad al suplemento enriquecido con vitaminas y minerales, no encontramos virtualmente ninguna deficiencia en los niveles de B₁₂, Zn, Ca y P.

La valoración de vitamina B₁₂ en plasma o suero se usa rutinariamente para determinar el estado en que se encuentra, pero no siempre es fiable. Se aconseja para la valoración del déficit de la vitamina B₁₂ otros parámetros incluyendo el AMM en suero o plasma o la Hcy en sangre¹¹⁶. En nuestro estudio tampoco observamos valores alterados de AMM en los pacientes en los que se determinó. Sin embargo, en otros estudios si se ha descrito déficit de vitamina B₁₂^{111, 115, 207, 213-215}. En un estudio para valorar el riesgo cardiovascular en pacientes con PKU Schulpis *et al*²¹⁵ observaron que los pacientes con PKU que seguían una dieta estricta tenían niveles bajos de vitamina B₆, vitamina B₁₂ y folato, dando lugar a una hiperhomocisteinemia moderada²¹³. Se ha visto que los sujetos de mayor edad, incluido adolescentes, que no cumplen con el tratamiento dietético o que siguen una dieta con poca restricción pero que no consumen alimentos ricos en B₁₂ como proteínas de origen animal sino más bien realizan una dieta vegana presentan mayor riesgo de déficit de esta vitamina⁵⁹. También se han descrito casos de pacientes a tratamiento con BH4 que a pesar de no necesitarlo, por miedo o por rechazo, realizan una dieta con escaso aporte de proteínas de origen animal, como hemos comentado previamente, y por lo tanto, también están en riesgo de presentar déficit de B₁₂²¹⁴. En nuestro estudio también pudimos observar que los pacientes que recibían tratamiento con BH4 tenían niveles de B₁₂ más bajos que los que no lo recibían.

Curiosamente, las concentraciones de B₁₂ y Zn mostraron una correlación positiva con la severidad de la deficiencia de HPA. Esto es probablemente debido al hecho de que, aunque hay una menor aportación de estos dos marcadores a través de alimentos naturales en pacientes con PKU clásica, el contenido de vitamina B₁₂ de los suplementos de aminoácidos libres de Phe es alto y, sorprendentemente, la eficiencia de

absorción de las sales de zinc de los suplementos parece ser más alta que el Zn procedente de los alimentos naturales¹⁰⁵.

Por el contrario, si se detectaron concentraciones altas de ácido fólico en el 39% de los pacientes, descritos de forma similar en estudios previos^{59, 107, 109-111, 216-218}, especialmente en pacientes con una menor tolerancia a la fenilalanina. La causa principal de las concentraciones elevadas de ácido fólico parece el excesivo aporte a través de los suplementos de aminoácidos libres de Phe¹²², así recibiendo el equivalente a 60 g de proteína a través de los suplementos se aporte 400 µg/día de ácido fólico¹⁰⁵. Zienliska *et al*¹⁰⁷ al valorar el aporte de ácido fólico y las concentraciones en sangre del mismo observaron que el 76% de los pacientes estudiados excedían la cantidad diaria de ácido fólico recomendado. En esta misma línea en nuestro estudio pudimos observar que los pacientes con MHPA presentaban menores niveles de ácido fólico que los pacientes con CPKU, los cuales recibían un mayor porcentaje de suplementación dietética con AA libres de Phe.

A pesar de los altos niveles de folato en el suero, no hay suficiente evidencia de sobrecarga de folato dado que, aunque el folato sérico es un marcador útil del estado del ácido fólico, puede ser variable, con concentraciones influenciadas por el consumo reciente de una comida con alto contenido de ácido fólico, suplementos diarios o intermitentes de ácido fólico y la administración de medicamentos²¹⁹.

Aunque hay alguna sugerencia de que el exceso de ácido fólico interfiere con la homeostasis del Zinc^{113, 117} ha habido poca investigación sobre el impacto a largo plazo de la alta suplementación de elementos individuales en la biodisponibilidad de otros nutrientes¹⁰⁸. No obstante se ha objetivado que la restricción proteica y los aportes elevados de vitaminas del grupo B y de fólico a los que están expuestos los pacientes PKU a tratamiento dietético, particularmente CPKU, conlleva un aumento de la vía de la remetilación, que se pone de manifiesto en el descenso de los niveles de Hcy, Metionina, Arginina (Arg) y Citrulina, junto con un aumento de la trans-sulfuración (elevación de Cistina, Glicina, Ornitina). Ello supone una menor disponibilidad de grupos metilo para otras reacciones metabólicas. Así se comprobó que en las

relacionadas con la vía Arg-ADMA (dimetilarginina asimétrica)-NO (óxido nítrico) en efecto existe una menor producción de ADMA²¹⁸. Todo ello ha alertado a la industria a modificar sus productos especiales particularmente en cuanto a las concentraciones de fólico y B₁₂.

El Se es un micronutriente importante para los pacientes con PKU, ya que debido a sus funciones como defensa antioxidante celular podría ayudar a corregir el proceso de estrés oxidativo que posiblemente contribuye, al menos en parte, a los síntomas neurológicos encontrados en pacientes fenilcetonúricos²²⁰. Desde hace varios años, al observar que los pacientes con PKU que recibían una dieta muy restringida en Phe presentaban niveles disminuidos de Se^{105, 122}, se ha añadido Se a los suplementos de aminoácidos exentos de Phe. Sin embargo en una cohorte francesa con 153 muestras, el 51% de las concentraciones plasmáticas de Se estaban por debajo del rango de referencia utilizando suplementos de aminoácidos sin Phe con Se agregado⁵⁶. Hay que tener presente que el Se que se emplea en las fórmulas de suplementación es en forma inorgánica, el cual es peor absorbido que en su forma orgánica. En nuestro estudio el Se estaba por debajo del rango en un tercio de los pacientes, siendo en su mayoría sujetos con PKU clásica y por tanto pacientes que recibían en mayor o menor porcentaje de suplementación con fórmula.

La cantidad de Se en los suplementos varía de 6 a 16µg por cada 10g de equivalente proteico y podría no ser suficiente en algunos casos⁵⁹. Se sabe que la absorción intestinal de selenio es mayor si la fuente de la dieta proviene de la proteína animal. De hecho, en nuestro estudio en los pacientes tratados con BH4 y que reciben un mayor porcentaje de proteínas de origen natural, sólo un porcentaje muy pequeño (el 2,56%) mostró niveles bajos de Se, sin embargo, en pacientes con una mayor adherencia al tratamiento, se encontraron bajas concentraciones en el 76,92% de ellos. Lambruschinia *et al*²²¹ en un estudio para evaluar los pacientes a tratamiento con BH4 observó que los niveles de Se habían aumentado de forma significativa tras un año de tratamiento.

Una ingesta adecuada de Ca, P y 25-OH vitD es necesaria para la formación ósea óptima, pero no es suficiente para el desarrollo óseo normal, varios factores pueden

influir en la DMO de los pacientes con PKU. Diversos estudios han demostrado que la deficiencia en la ingesta de proteínas puede influir en la masa ósea^{109, 134, 222, 223}. En esta misma línea, también se ha visto que los pacientes con BH4 presentan una mejor masa ósea¹³⁵. Nuestros pacientes en general tenían niveles adecuados de Ca y P, pero se observaron niveles bajos de 25-OH vitD en el 14% de ellos. Pensamos que este hallazgo estuvo más relacionado con el origen de los pacientes, debido a que los pacientes procedentes del norte de España (Galicia y País Vasco) presentan mayor predisposición a padecer este déficit con respecto a los del Mediterráneo debido a la gran diferencia en las horas de sol¹³⁴.

Se ha publicado que los pacientes bajo tratamiento con BH4 pueden tener una deficiencia significativa de algunos de los micronutrientes al recibir menos producto dietético y puede ser necesaria la administración de suplementos⁷¹. Sin embargo, en este estudio solo se detectó una diferencia significativa en el nivel B₁₂ entre los grupos tratados con BH4 y los grupos sin tratamiento como hemos comentado previamente. También pudimos observar niveles ligeramente inferiores en cuanto al P, Fe, fólculo y Zn, sin embargo, en este caso no fue estadísticamente significativo. Esto puede ser debido a que el número de pacientes a tratamiento con BH4 no es suficiente para establecer diferencias.

En cuanto a los depósitos de hierro se ha visto que incluso con una ingesta adecuada de hierro, hay estudios que han demostrado deficiencia de hierro en las personas con PKU²²⁴, aunque con una frecuencia similar a la población general¹⁰⁵. Otros autores²²⁵ observaron que los pacientes mal controlados tenían niveles más bajos de ferritina, con unas cifras de hemoglobina y hematocrito dentro de la normalidad. En nuestro estudio se pudo observar que el nivel de ferritina fue menor en pacientes con MHPA frente a pacientes con PKU, teniendo la hemoglobina y el hematocrito normales en todos los casos. Estos hallazgos están probablemente relacionados con la suplementación con fórmula enriquecida con hierro y con la alta suplementación de ácido ascórbico en la dieta, que a pesar de que la fuente de hierro de los suplementos es en forma de sulfato ferroso y por lo tanto con menor biodisponibilidad que la forma hemo, la vitamina C mejora la absorción.

Dentro de la monitorización y seguimiento de los pacientes con PKU y teniendo en cuenta que reciben una dieta restringida en proteínas naturales también es importante valorar otros parámetros bioquímicos como son las proteínas totales y la prealbúmina. La prealbúmina es un predictor mucho más sensible del estado de las proteínas plasmáticas que la albúmina y las proteínas totales. En nuestro estudio, los niveles de Palb disminuyeron en el 34,6% de los pacientes, con el nivel de proteínas totales dentro del rango en la mayoría de los pacientes, lo que confirma que la Palb plasmática es un marcador más sensible del estado de malnutrición. Además, la mayoría de los pacientes con Palb baja presentaban una adecuada adherencia al tratamiento. Datos similares fueron observados por Kose *et al*¹¹¹.

6.2 EVALUACIÓN DE LA RIGIDEZ ARTERIAL MEDIANTE TONOMETRÍA POR APLANAMIENTO EN PACIENTES CON FENILCETONURIA.

La enfermedad del sistema circulatorio es la primera causa de muerte en España, seguida de los tumores y de las enfermedades del sistema respiratorio²²⁶. Hay una lucha continua por conseguir una reducción de los episodios cardiovasculares en la población, por lo que actualmente todos los esfuerzos están dirigidos a la prevención de la enfermedad cardiovascular. Una de las estrategias preventivas es identificar a los individuos con riesgo de presentar episodios cardiovasculares a un plazo de 10 años¹⁷⁰.

Es bien sabido que el mayor riesgo de padecer enfermedad renal, coronaria, cerebrovascular, arterial periférica y otras consecuencias en relación con la hipertensión arterial está ligado a las cifras de PA que tenga cada individuo²²⁷.

Tradicionalmente debido a la sencillez de la técnica y a su accesibilidad se viene empleando la medición de la PA periférica como parámetro que se correlaciona con eventos cardiovasculares. Esta viene dada únicamente por los picos máximo y mínimo de presión (PAS y PAD) sin tener en cuenta el resto de la onda de pulso, además se ve influenciada por el momento de la determinación, el lugar y el hecho de que se trata de un valor aislado.

Varios estudios han demostrado mayor correlación de la PA central con diversos marcadores de lesión orgánica subclínica como la hipertrofia del ventrículo izquierdo o el espesor de la íntima, en comparación con la PA periférica¹⁷¹. La PA periférica, no se corresponde con la PA central, sobre todo en gente joven.

Debido a la naturaleza elástica de la pared aórtica, el flujo sanguíneo que es pulsátil a la salida del corazón es amortiguado evitando un aumento de presión durante la sístole, además el retroceso elástico de la pared durante la diástole favorece un flujo sanguíneo continuado, limitando así la caída de presión durante la diástole y favoreciendo el flujo coronario. La disminución de las propiedades elásticas de la aorta conduce a un aumento de la PAS, así como disminución de la PAD y como consiguiente un aumento de la presión de pulso. Así se ha visto que el aumento de rigidez de la aorta y otras arterias de gran tamaño se asocia con morbilidad y mortalidad cardiovascular¹⁵¹. El incremento en la PAS y la presión de pulso va a favorecer la hipertrofia ventricular izquierda, la insuficiencia ventricular y el proceso aterosclerótico. La disminución en la PAD va a afectar a la perfusión coronaria. Por ello, la determinación de la distensibilidad arterial como método que permite predecir las alteraciones cardiovasculares precoces cada vez está tomando más protagonismo. Las directrices de la ESC respaldan el empleo de la medición de la rigidez arterial cuando sea posible, como una medida más del riesgo cardiovascular¹⁴³.

Para valorar la rigidez arterial se pueden emplear numerosas modalidades no invasivas y hay una serie de revisiones que hacen referencia a ellas^{146, 159, 169, 183, 193, 228, 229}. Como se ha revisado recientemente, una de las técnicas no invasivas, sencillas, reproducibles y validadas que se pueden utilizar es la tonometría de aplanamiento. Mediante esta técnica se puede obtener la VOP carótido-femoral y el análisis de la onda de pulso a partir de la determinación de la PA a nivel de la arteria radial.

Con la PWA es posible derivar el Aix@HR75. El Aix representa el porcentaje de presión de pulso que es debido a la onda de reflexión. Como la rigidez arterial provoca el retorno temprano de las ondas de presión arterial reflejadas desde la periferia, origina un aumento en la presión de perfusión, por lo tanto se puede emplear para medir la

rigidez arterial. Por norma general el Aix se ajusta en función de la frecuencia cardíaca, recogiendo una frecuencia cardíaca estándar de 75 lpm, que es lo que llamamos el Aix@HR75. El Aix@HR75 también es predictor de riesgo cardiovascular¹⁷⁶, además se relaciona con otras medidas de rigidez arterial como la VOP¹⁷⁵ que de por sí se correlaciona con factores de riesgo cardiovascular¹⁶¹. Por tanto, la VOP y el Aix son marcadores de rigidez arterial sistémica, ambos predictores de eventos cardiovasculares adversos^{162, 230}.

Para la evaluación de la PAW y VOP el dispositivo más utilizado y mejor validado incluso en niños y adolescentes es el sistema Sphygmocor^{163, 164}. La VOP es también considerada en niños y adolescentes, como el método más utilizado y aceptado para la evaluación de la rigidez vascular según lo establecido por la American Heart Association Comité de Aterosclerosis, Hipertensión y Obesidad en la Juventud del Consejo sobre Enfermedades Cardiovasculares en los Jóvenes¹⁴⁸.

Tanto la VOP como Aix@HR75 aumentan con el aumento de la rigidez arterial y el daño vascular. Con la edad se produce una disminución de la elasticidad de los vasos sanguíneos, pero este proceso puede verse acelerado en el caso de enfermedades del tejido conectivo, alteraciones metabólicas como la diabetes, hígado graso no alcohólico, dislipemia, hipertensión arterial, alteraciones en el sueño y también en la enfermedad renal terminal¹⁴⁹⁻¹⁵³.

No se puede aplicar en la misma medida el valor de la VOP y Aix a pacientes mayores que jóvenes y que tengan factores de riesgo cardiovascular o no. Se han evaluado los valores normales de VOP y Aix @ HR75 para la población pediátrica y adulta^{165-167, 169, 231}.

Se ha visto que en los pacientes con PKU el riesgo cardiovascular puede estar aumentado¹⁰⁰ y presentan alteración de la capacidad antioxidante que puede contribuir a aumentar el riesgo de aterosclerosis¹⁰³. Sin embargo, otros estudios donde se valoró la presión arterial periférica en sujetos PKU que recibían tratamiento dietético comparado con controles observaron que los pacientes PKU presentaban una PAS y PAD menor

que los controles en el estudio realizado por Rocha *et al*²³² y una PAD menor sin encontrar diferencias en cuanto a la PAS en el estudio realizado por Huermer *et al*²³³. Nuestro estudio es pionero en valorar la PA central. Muestra una mayor VOP en pacientes con CPKU que los controles e incluso que los pacientes con PKU leve-moderada, independientemente del nivel de presión arterial periférica. Así que encontramos que los pacientes con PKU presentan mayor rigidez arterial. De hecho, el porcentaje de pacientes que tenía una VOP mayor que el percentil 90 fue mayor en los pacientes que en los controles.

En los pacientes con PKU también encontramos un aumento de la PP y el Aix@HR75 con respecto a los controles. Por lo tanto, los dos marcadores predictores de eventos cardiovasculares adversos (VOP y Aix) se encontraron aumentados en los pacientes de nuestro estudio.

Ese aumento de presión que no se ve amortiguado debido a la rigidez arterial también se extiende a la microcirculación de órganos con baja resistencia vascular como son los riñones y el cerebro. Así se ha descrito enfermedad de los pequeños vasos a nivel cerebral con el consiguiente deterioro cognitivo en personas de edad avanzada y en pacientes más jóvenes¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ y aceleración del deterioro en la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica previa¹⁵⁵ así como aumento de la albuminuria y empeoramiento de la filtración glomerular en pacientes con diabetes^{182, 186, 187}. En este sentido, se ha involucrado recientemente, en las Guías de Manejo de Hipertensión ESC/ESH¹⁴³ la VOP como indicador de daño de órganos de baja resistencia vascular cuando es mayor de 10m/segundo. Por cada incremento de desviación estándar en VOP, el riesgo de un evento cardiovascular (incluyendo enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular o muerte cardiovascular) aumentó en 16% a 20% en la población general²³⁴.

Como ya se ha referido previamente la edad ya *per se* produce una serie de cambios en la pared de las arterias que origina una alteración en la distensibilidad de las mismas, por lo tanto aumenta los marcadores de rigidez arterial como la VOP y el AIX. Los resultados de este estudio indican que la mediana de Phe se correlaciona positivamente

con la VOP carótido-femoral en sujetos con PKU. A mayor concentración de Phe mayor VOP. El efecto del aumento de la VOP en este caso es aditivo al efecto de la edad per se, ya que la edad media de cada grupo fue esencialmente similar. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que esta relación entre los niveles de Phe y la rigidez arterial no dependen de la edad. Este dato puede estar en relación con lo que se ha visto en otros estudios, donde los pacientes mal controlados y diagnosticados de forma más tardía y por tanto, expuestos a niveles de Phe más elevados presentan un aumento del estrés oxidativo que puede contribuir a empeorar el perfil aterogénico de estos pacientes¹⁰³.

Debido al tratamiento dietético que reciben los pacientes con PKU se ha visto que son un grupo de riesgo de presentar alteraciones metabólicas y exceso de peso²³⁵. En este sentido los resultados de los diferentes estudios son contradictorios. Hay varias publicaciones que hacen referencia a una mayor tendencia al sobrepeso y la obesidad en pacientes con PKU, sobre todo a medida que la edad aumenta^{95-97,199, 236,237}, sin embargo hay otros estudios que afirman que con un tratamiento correcto el desarrollo en pacientes con PKU puede ser similar a la población sin PKU^{71, 198, 212, 232, 238, 239}. Es difícil comparar los resultados publicados debido a las diferencias en la edad, los distintos enfoques en cuanto al tratamiento y al control metabólico así como la falta de uniformidad para definir el sobrepeso en la población.

A pesar de ello, es importante la detección de parámetros que permitan valorar e identificar la existencia de síndrome metabólico en pacientes con fenilketonuria y así prevenir la aparición de otras enfermedades en estos pacientes como la diabetes y la enfermedad cardiovascular porque a pesar de que los pacientes con PKU con exceso de peso se comportan de manera similar a los individuos obesos sin PKU como observaron Rocha *et al*²³² y Kanufre *et al*⁹⁸, los sujetos con PKU con exceso de peso pueden ser más susceptibles a presentar síndrome metabólico debido a factores inherentes a la enfermedad⁹⁸.

La Federación Internacional de Diabetes (IDF) considera que la medición del HDL-C, los TG, la glucemia asociado a la medición de la circunferencia de cintura pueden ser

los parámetros que identifiquen la existencia enfermedad metabólica ²³⁵. En nuestra cohorte, encontramos una mayor tendencia a sobrepeso en pacientes PKU que en controles, aunque no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en el IMC ni en el perímetro de la cintura en los pacientes con PKU con respecto a los controles. En general, no se conoce bien si la causa de mayor sobrepeso y obesidad en paciente con PKU pueda ser resultado de una condición subyacente, consecuencia de un mal control metabólico o probablemente influya el resultado del tratamiento²³⁶.

Una de las posibilidades de que los pacientes con PKU tengan un IMC y un aumento de adiposidad a nivel abdominal, medido por la circunferencia de cintura, puede estar relacionado con la ingesta de un sustituto proteico a base de una fórmula de aminoácidos exenta de Phe, que tiene un mayor contenido en hidratos de carbono. Moretti et al²⁴⁰ en un estudio donde se valoró el índice glucémico de la dieta de niños con fenilcetonuria observaron que en comparación con los controles sanos los paciente con PKU consumieron menos proteínas y grasas pero más hidratos de carbono y fibra. En la Unidad Metabólica de nuestro Centro Hospitalario se comunicó recientemente, Couce *et al*²⁴¹, una valoración en este sentido al observar que los pacientes PKU tienen riesgo de resistencia a la insulina más evidente en adultos y con sobrepeso, en probable relación con el más alto aporte calórico por el contenido de carbohidratos en los productos dietéticos. Así en nuestro estudio se vio que los pacientes con menor tolerancia de Phe y por lo tanto mayor restricción de proteínas naturales de alto valor biológico mostraron un IMC y una circunferencia de cintura mayor que los pacientes que toleraban un aporte mayor de Phe a través de la dieta, sin que estos hallazgos fueran estadísticamente significativos. En aquellos pacientes con un fenotipo de PKU sensible a BH4 que suele ser pacientes con PKU leve o moderada, presentan una mejor tolerancia de Phe, lo que permite relajar las restricciones dietéticas e incluso en algunos casos poder realizar una dieta sin necesidad de aporte de suplementos proteicos con bajo contenido de Phe ^{50, 242}. Teniendo esto en cuenta, pudimos observar que los pacientes de nuestro estudio que no recibían tratamiento con BH4 tenían un IMC y una circunferencia de cintura mayor que los pacientes bajo tratamiento con BH4 y por tanto con una dieta con menor porcentaje de suplementación con fórmula de aminoácidos libre de Phe.

En esta misma línea, Rocha *et al*²³² y Belanger *et al*²³⁹ sugirieron que el exceso de peso en pacientes con PKU podría estar relacionado con la gravedad de la enfermedad y por lo tanto con un mayor aporte de sustituto proteico a base de una fórmula de AA libre de Phe, sin embargo Kanufre *et al*²³⁵ en un estudio donde se compararon pacientes PKU con exceso de peso y normopeso no encontró diferencias en cuanto a la severidad de la enfermedad.

La falta de adherencia al tratamiento dietético también puede tener un impacto negativo en la prevalencia a la obesidad²³⁶. Robertson *et al*¹⁹⁸ demostró una correlación directa entre el aumento de IMC y mayor concentración de Phe en sangre y Rocha *et al*²³² mostraron que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en pacientes mal controlados era mayor que en pacientes con un adecuado cumplimiento del tratamiento. En nuestro estudio sólo un pequeño porcentaje de pacientes presentaban un mal control metabólico, además los pacientes que no realizaban correctamente la dieta eran todos mayores de edad, lo que va a favor de que con la edad el cumplimiento dietético es más complicado.

Otro de los factores que se postulan como causa de exceso de peso en pacientes con PKU es la disminución de la actividad física debido a la carga social que implica el seguimiento de este tipo de dieta, asociado a un mal funcionamiento ejecutivo, habilidades organizativas o alteraciones en el estado de ánimo^{198, 236}. Por lo tanto, es importante que la monitorización de los pacientes con PKU no solo se limite a los aspectos nutricionales y metabólicos sino también se debe fomentar el aumento de actividad física como medida de prevención del sobrepeso y obesidad²³⁶.

Hay estudios que hacen referencia a que la acumulación excesiva de grasa, sobre todo a nivel abdominal se asocia a un aumento de rigidez de las grandes arterias contribuyendo a un aumento de la PAS^{243,244}. Dengo *et al*.²⁴⁵ demostraron mediante un estudio aleatorizado y controlado que con la pérdida de peso de un 5% a un 10% disminuyeron la rigidez arterial en pacientes adultos con sobrepeso y obesidad.

En nuestro estudio observamos una correlación positiva entre las mediciones antropométricas (peso, IMC y circunferencia de cintura) y la VOP en pacientes con

PKU que también pueden ser la base del riesgo cardiovascular dependiente de la obesidad.

En esta misma línea observamos que los sujetos con menor tolerancia de Phe presentaban un VOP más elevada que los pacientes con mayor tolerancia a Phe y por tanto una dieta menos restringida en proteínas naturales. Con respecto al tratamiento con BH4, la VOP fue menor en aquellos sujetos con PKU bajo tratamiento que sugirieron una mejor función endotelial como se informó anteriormente en modelos animales cuando la administración oral crónica de BH4 también aumentó la producción de BH4 vascular de óxido nítrico a partir de células endoteliales²⁴⁶.

Aunque la discusión sobre si los adultos con PKU tienen una alta incidencia comprobada de eventos cardiovasculares sigue siendo controvertida, debemos tener en cuenta que el IMC se correlaciona con otros factores de riesgo cardiovasculares tales como mayores niveles de triglicéridos, homocisteína y presión arterial. También se ha informado de un aumento de las concentraciones de adiponectina en sujetos con PKU mal controlados, lo que podría moderar su riesgo de disfunción endotelial y aterogénesis²⁴⁷.

La concentración de colesterol de los niños con PKU se ha analizado en un número limitado de estudios. En comparación con los controles sanos, los niños con PKU a tratamiento dietético suelen presentar niveles más bajos de colesterol^{99, 129, 248} particularmente las partículas de lipoproteínas de baja densidad⁵⁷. Las bajas concentraciones de colesterol en pacientes con PKU pueden ser explicadas por factores genéticos, por la inhibición de la síntesis del colesterol o bien por la dieta no aterogénica o vegetariana que reciben estos pacientes^{8, 99, 235, 248, 249}. Se ha demostrado de forma experimental que la HPA inhibe dos de las principales enzimas reguladoras (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (EC: 1.1.1.98) y mevalonato-5-pirofosfato descarboxilasa (CE: 4.1.1.33)) de colesterologénesis hepática y cerebral²⁵⁰. En este sentido Colome *et al*⁹⁹ observaron al comparar pacientes con PKU a dieta restringida en Phe con pacientes que recibían una dieta similar pero presentaban otro EIM, que las cifras de colesterol eran más bajas en los pacientes PKU. Además, también encontraron una correlación

negativa entre las cifras de Phe en plasma y los niveles de colesterol. Estos datos van más a favor de la relación entre los niveles altos de Phe y la inhibición de la colesterogénesis.

En nuestro estudio, las concentraciones de colesterol en plasma, HDL-C y LDL-C fueron menores en los pacientes con PKU que en los controles, aunque no alcanzó significación estadística.

En el caso de los triglicéridos séricos no fueron significativamente diferentes en la PKU que en los controles sanos, que se encontraban dentro del rango normal, al contrario que lo observado por Colome *et al*⁹⁹ donde los triglicéridos se encontraban significativamente más elevados en los pacientes con PKU que en un grupo de sujetos sanos y que en un grupo de pacientes con MHPA que no recibían restricción dietética.

Es interesante observar que a pesar del perfil menos aterogénico en términos de niveles de colesterol, los pacientes con PKU presentan un aumento en la rigidez arterial, lo que sugiere diferentes vías etiopatogénicas. Verduci *et al*²⁴⁷ en un estudio cuyo objetivo era valorar la posible relación de la dieta restringida en Phe con factores de riesgo cardiovascular no observó diferentes riesgos cardiovasculares en comparación con la población sin alteración genética. Tal vez debido a una elevación moderada de la homocisteína plasmática relacionada con bajos niveles de vitamina B₁₂ y folato que se puede observar en pacientes con PKU que realizan una dieta estricta con una ingesta proteica de bajo valor biológico²¹⁵ podría ser una de las causas. También se sugirió anteriormente valores elevados de proteína C reactiva de alta sensibilidad en pacientes adultos con PKU como marcador temprano de disfunción endotelial¹³⁴.

Ciertos factores deben considerarse en la interpretación de estos resultados como limitaciones del estudio. Primero, debido al diseño, no podemos determinar las circunstancias exactas involucradas en el aumento de la rigidez arterial entre los pacientes con PKU ya que no se puede establecer ninguna relación de causalidad. Debido al número de pacientes evaluados, algunas diferencias en el análisis de subgrupos pueden no haber alcanzado significación estadística. Es posible que otros

factores, como las alteraciones cardio-metabólicas familiares heredadas, el hábito de fumar o la actividad física regular, puedan haber explicado algunas de las diferencias en la rigidez arterial. Por el contrario, este estudio tuvo una serie de fortalezas, incluyendo un gran número de variables investigadas para explorar las asociaciones con la rigidez arterial. Además, el modelo utilizado fue robusto ya que solo se incluyeron grabaciones de alta calidad en el análisis.

El estudio ha demostrado que la tonometría de aplanamiento es un método simple y no invasivo que puede usarse para detectar rigidez aórtica elevada en pacientes con PKU. Se justifican estudios longitudinales adicionales, con un tamaño de muestra más grande, para investigar el impacto de la rigidez aórtica elevada sobre el pronóstico cardiovascular en este grupo.





CONCLUSIONES





7 CONCLUSIONES:

- 1 Los pacientes con hiperfenilalaninemia, particularmente los que presentan fenilcetonuria clásica, tienen un riesgo elevado de alteración de los marcadores bioquímicos nutricionales (en nuestra serie el 81,4%), probablemente debido a que su dieta tiene una mayor restricción de proteínas de alto valor biológico y suplementación con fórmula dietética especial exenta de Phe
- 2 El Selenio es el micronutriente que se halla más frecuentemente disminuido en los pacientes fenilcetonúricos, en probable relación con el hecho de que el enriquecimiento de las fórmulas especiales se realiza con forma inorgánica, de menor biodisponibilidad.
- 3 La prealbúmina, como marcador más sensible del estado nutricional de las proteínas plasmáticas, está disminuida en un porcentaje significativo de pacientes fenilcetonúricos (en nuestra serie el 34,6%). Este hecho guarda relación con la mayor restricción de proteínas naturales de alto valor biológico
- 4 Un 39% de los pacientes fenilcetonúricos de nuestro estudio, particularmente los pacientes con PKU clásica, presentan concentraciones elevadas de ácido fólico y niveles vitamina B₁₂ en el límite alto de la normalidad. Esto puede tener importantes repercusiones metabólicas, dada la mayor activación de la vía de los aminoácidos sulfurados y consecuentemente la menor disponibilidad de grupos metilo para otras reacciones metabólicas. Se debe tener esto en cuenta para reconsiderar el ajuste de estos micronutrientes en los suplementos de formulaciones especiales libres de fenilalanina.
- 5 Un porcentaje elevado de los pacientes de nuestro estudio tiene un adecuado cumplimiento dietético y terapéutico, sin embargo, se va objetivando una peor adherencia a la dieta al aumentar la edad, particularmente en los pacientes mayores de 12 años y sobre todo en los adultos mayores de 18 años. Por lo tanto, el seguimiento dietético y la monitorización del estado nutricional de los pacientes con PKU debe formar parte de un programa que continúe de por vida.

- 6 Los hallazgos de nuestro estudio muestran que los pacientes fenilcetonúricos tienen una rigidez aórtica mayor, medida de forma no invasiva por la velocidad de onda de pulso (VOP) carotídeo-femoral en comparación con los controles sanos. Además, pudimos observar que los pacientes con un fenotipo más grave presentan mayor VOP y por tanto mayor rigidez arterial.
- 7 Nuestros hallazgos muestran que los pacientes fenilcetonúricos a tratamiento con sapropterina, tienen menor riesgo de desarrollar aterosclerosis, al presentar una VOP más baja, y alteraciones nutricionales, incluidos los niveles de selenio y ácido fólico.
- 8 En este estudio pudimos comprobar que marcadores de riesgo cardiovascular, como la velocidad de la onda de pulso y el índice de potenciación ajustado según 75lpm de frecuencia cardíaca (AIXR75), se pueden ver afectados por una mayor edad, peso, índice de masa corporal, circunferencia de cintura y presión arterial sistólica y diastólica central. Por tanto, podrían ser factores a tener en cuenta a la hora de incidir en el control y manejo del riesgo cardiovascular.
- 9 Los resultados de este estudio corroboran la necesidad en los pacientes con fenilcetonuria de la monitorización periódica y estrecha de los marcadores bioquímicos nutricionales, incluyendo Selenio, vitamina B₁₂ y ácido fólico. Además, la tonometría de aplanamiento debe ser considerada en estos pacientes para la caracterización del riesgo cardiovascular y como una posible guía para la terapia dirigida.



BIBLIOGRAFÍA





8 BIBLIOGRAFÍA

1. Kaufman S, Berlow S, Summer GK, Milstien S, Schulman JD, Orloff S, et al. Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. A variant form of phenylketonuria. *N Engl J Med.* 1978;299(13):673-9.
2. Blau N, Martinez A, Hoffmann GF, Thony B. DNAJC12 deficiency: A new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemias. *Mol Genet Metab.* 2018;123(1):1-5.
3. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thony B, Shen N, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):257-66.
4. Arrieta Blanco F, Belanger Quintana A, Vazquez Martinez C, Martinez Pardo M. Importance of early diagnosis of phenylketonuria in women and control of phenylalanine levels during pregnancy. *Nutr Hosp.* 2012;27(5):1658-61.
5. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010;376(9750):1417-27.
6. Martín Sánchez M.J, Dalmau Serra J. Errores innatos del metabolismo: aproximación diagnóstica en Atención Primaria. *Bol Pediatr.* 2007;47:111-5.
7. Garcia Jiménez MC, Baldellou Vázquez A. Trastornos del metabolismo de los aminoácidos I. Curso de Formación en Enfermedades Raras Metabólicas. 2º ed. 2010.
8. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev.* 2008;29(1):31-41.
9. Scriver CR Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8ºed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667–724.
10. Folling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;407:4-10.
11. Campistol J, Lambruschini N, Gómez-López, L, Gutierrez A, Fusté E, Vilaseca M.A. . Hiperfenilalaninemias. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editor. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias.* 4º ed. Madrid: Ergon; 2014. p. 455-77.

12. Fölling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. 1934. p.169.
13. Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. Biochem J. 1937;31(2):266-74.
14. Guttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. Acta Paediatr Scand Suppl. 1980;280:1-80.
15. Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. J Biol Chem. 1947;169(3):651-6.
16. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. Proc Soc Exp Biol Med. 1953;82(3):514-5.
17. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. Lancet. 1953;265(6790):812-3.
18. Dhondt JL. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. J Inherit Metab Dis. 2007;30(4):418-22.
19. Wilson JMG JG. Principles and practice of screening for disease. Geneva: World Health Organisation. 1968:26-9.
20. Ramos DEC. Programa de Cribado Neonatal. En: Molecular SEDBCyP, editor. Curso "online" de cribado Neonatal. 1º ed.
21. Tada K, Yoshida T, Mochizuki K, Konno T, Nakagawa H. Two siblings of hyperphenylalaninemia: suggestion to a genetic variant of phenylketonuria. Tohoku J Exp Med. 1970;100(3):249-53.
22. Woo SLC, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJH. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. Nature. 1983;306:151.
23. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. J Pediatr. 1999;135(3):375-8.
24. Cocho de Juan JA, Castiñeiras Ramos D, Bóveda Fontán MD, Cólón Mejeras C, Fernández Marmiesse A, Couce Pico ML, Fraga Bermúdez JM. Cribado neonatal de los

- errores congénitos del metabolismo. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editor. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4º ed. Madrid: Ergon; 2014. p. 45-68.
25. Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, et al. The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders. *Mol Genet Metab Rep*. 2016;9:61-6.
26. Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(6):963-73.
27. van Spronsen FJ, van Wegberg AM, Ahring K, Belanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(9):743-56.
28. Belanger-Quintana A, Campistol J, Stanescu S, Gassió R, Castro M, Arrieta F, Martínez-Pardo M. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninurias. En: *Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo*. 2º ed. Madrid: Ergon; 2018. p. 67-83.
29. Couce ML, Castineiras DE, Boveda MD, Bana A, Cocho JA, Iglesias AJ, et al. Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):470-5.
30. Desviat LR, Perez B, Garcia MJ, Martínez-Pardo M, Baldellou A, Arena J, et al. Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur J Hum Genet*. 1997;5(4):196-202.
31. [cited 22-11-2018]. Available from: <http://www.biopku.org>.
32. Erlandsen H, Fusetti F, Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol*. 1997;4(12):995-1000.
33. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics*. 2003;112(6 Pt 2):1557-65.
34. Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR. Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates

- a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab.* 2000;69(2):101-10.
35. Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Sriver CR. En vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat.* 1998;11(1):4-17.
36. Pey AL, Stricher F, Serrano L, Martinez A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet.* 2007;81(5):1006-24.
37. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998;63(1):71-9.
38. Staudigl M, Gersting SW, Danecka MK, Messing DD, Woidy M, Pinkas D, et al. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Hum Mol Genet.* 2011;20(13):2628-41.
39. van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Belanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12(1):162.
40. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat.* 2016;37(6):508-15.
41. Aldamiz-Echevarria L, Llarena M, Bueno MA, Dalmau J, Vitoria I, Fernandez-Marmiesse A, et al. Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4 responsiveness in Spanish patients with phenylketonuria. *J Hum Genet.* 2016;61(8):731-44.
42. Couce ML, Boveda MD, Fernandez-Marmiesse A, Miras A, Perez B, Desviat LR, et al. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene.* 2013;521(1):100-4.
43. van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inher Metab Dis.* 2009;32(1):46-51.
44. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S2-9.

45. Guldberg P, Guttler F. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: methods for their characterization. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;407:27-33.
46. Christ SE. Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci.* 2003;12(1):44-54.
47. Weglage J, Pietsch M, Funders B, Koch HG, Ullrich K. Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 1995;84(4):411-5.
48. Manti F, Nardecchia F, Chiarotti F, Carducci C, Carducci C, Leuzzi V. Psychiatric disorders in adolescent and young adult patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2016;117(1):12-8.
49. Costello PM, Beasley MG, Tillotson SL, Smith I. Intelligence in mild atypical phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1994;153(4):260-3.
50. Martínez-Pardo M, García Muñoz M. Hiperfenilalaninemias por déficit de cofactor BH4. En: Sanjuro P, Baldellou A, editor. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 4º ed. Madrid. Ergon; 2014. p. 479-87.
51. Correcher Medina P, Pedrón Marzal G, Rey Simón R, Calvo Rigual F. Venopunción en el dorso de la mano. ¿Una alternativa a la punción del talón? *An Pediat (Barc).* 2012;77(6):381-5.
52. Anjema K, Hofstede FC, Bosch AM, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Boelen CC, et al. The neonatal tetrahydrobiopterin loading test in phenylketonuria: what is the predictive value? *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:10.
53. Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med.* 2011;13(8):697-707.
54. Smith I, Beasley MG, Ades AE. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child.* 1990;65(5):472-8.
55. Yi SH, Singh RH. Protein substitute for children and adults with phenylketonuria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(2):CD004731.
56. Feillet F, Agostoni C. Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):659-64.
57. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nut Metab.* 2012;9(1):7.

58. Acosta PB. Recommendations for protein and energy intakes by patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S121-4.
59. MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M, Feillet F. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S10-8.
60. Gassio R, Artuch R, Vilaseca MA, Fuste E, Boix C, Sans A, et al. Cognitive functions in classic phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia: experience in a paediatric population. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47(7):443-8.
61. van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S90-5.
62. Spécola N, Chiesa A. Alternative therapies for PKU. *JIEMS.* 2017;5:1-5.
63. Vilaseca MA, Lambruschini N, Gomez-Lopez L, Gutierrez A, Moreno J, Tondo M, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acid status in phenylketonuric patients treated with tetrahydrobiopterin. *Clin Biochem.* 2010;43(4-5):411-5.
64. Rohde C, von Teeffelen-Heithoff A, Thiele AG, Arelin M, Mutze U, Kiener C, et al. PKU patients on a relaxed diet may be at risk for micronutrient deficiencies. *Eur J Clin Nutr.* 2014;68(1):119-24.
65. Muntau AC, Burlina A, Eyskens F, Freisinger P, De Laet C, Leuzzi V, et al. Efficacy, safety and population pharmacokinetics of sapropterin in PKU patients <4 years: results from the SPARK open-label, multicentre, randomized phase IIb trial. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12(1):47.
66. Burton BK, Nowacka M, Hennermann JB, Lipson M, Grange DK, Chakrapani A, et al. Safety of extended treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria: results of a phase 3b study. *Mol Genet Metab.* 2011;103(4):315-22.
67. van Calcar SC, Ney DM. Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino Acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *J Acad Nutr Diet.* 2012;112(8):1201-10.
68. Van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, Etzel MR, Clayton MK, Wolff JA, et al. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids-. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(4):1068-77.

69. MacLeod EL, Clayton MK, van Calcar SC, Ney DM. Breakfast with glycomacropeptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;100(4):303-8.
70. Lim K, van Calcar SC, Nelson KL, Gleason ST, Ney DM. Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Mol Genet Metab.* 2007;92(1):176-8.
71. Macleod EL, Ney DM. Nutritional Management of Phenylketonuria. *Ann Nestle Eng.* 2010;68(2):58-69.
72. Ney DM, Gleason ST, van Calcar SC, MacLeod EL, Nelson KL, Etzel MR, et al. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis.* 2009;32(1):32-9.
73. Ney DM, Stroup BM, Clayton MK, Murali SG, Rice GM, Rohr F, et al. Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria: a randomized, controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(2):334-45.
74. Stroup BM, Ney DM, Murali SG, Rohr F, Gleason ST, van Calcar SC, et al. Metabolomic Insights into the Nutritional Status of Adults and Adolescents with Phenylketonuria Consuming a Low-Phenylalanine Diet in Combination with Amino Acid and Glycomacropeptide Medical Foods. *J Nutr Metab.* 2017;2017:6859820.
75. Pena MJ, Pinto A, Daly A, MacDonald A, Azevedo L, Rocha JC, et al. The Use of Glycomacropeptide in Patients with Phenylketonuria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018;10(11).
76. Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1169-78.
77. van Spronsen FJ, de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):671-6.
78. Concolino D, Mascaro I, Moricca MT, Bonapace G, Matalon K, Trapasso J, et al. Long-term treatment of phenylketonuria with a new medical food containing large neutral amino acids. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(1):51-5.
79. Blau N, Longo N. Alternative therapies to address the unmet medical needs of patients with phenylketonuria. *Expert Opinion Pharmacother.* 2015;16(6):791-800.

80. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2339-44.
81. Sumaily KM, Mujamammi AH. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis, and therapeutic strategies. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(5):63-70.
82. Longo N, Harding CO, Burton BK, Grange DK, Vockley J, Wasserstein M, et al. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2014;384(9937):37-44.
83. Eavri R, Lorberboum-Galski H. A novel approach for enzyme replacement therapy. The use of phenylalanine hydroxylase-based fusion proteins for the treatment of phenylketonuria. *J Biol Chem*. 2007;282(32):23402-9.
84. Ding Z, Georgiev P, Thöny B. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 2006;13(7):587-93.
85. Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thöny B. Correction of Murine PKU Following AAV-mediated Intramuscular Expression of a Complete Phenylalanine Hydroxylating System. *Mol Ther*. 2008;16(4):673-81.
86. Harding CO, Gillingham MB, Hamman K, Clark H, Goebel-Daghighi E, Bird A, et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther*. 2005;13:457.
87. Alexander IE, Cunningham SC, Logan GJ, Christodoulou J. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Ther*. 2008;15:831.
88. Brumm VL, Bilder D, Waisbren SE. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2010;99 Suppl 1:S59-63.
89. Ahring K, Belanger-Quintana A, Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, Lammardo AM, MacDonald A, et al. Blood phenylalanine control in phenylketonuria: a survey of 10 European centres. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(2):275-8.

90. Gentile JK, Ten Hoedt AE, Bosch AM. Psychosocial aspects of PKU: Hidden disabilities – A review. *Mol Genet Metab.* 2010;99:S64-S7.
91. González MJ, Gutiérrez AP, Gassi  R, Fust  ME, Vilaseca MA, Campistol J. Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a Follow-up Unit. *Mol Genet Metab.* 2011;104:S73-S9.
92. Walter JH, White FJ. Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria. *Int J Adolesc Med Health.* 2004;16(1):41-5.
93. Crone MR, van Spronsen FJ, Oudshoorn K, Bekhof J, van Rijn G, Verkerk PH. Behavioural factors related to metabolic control in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(5):627-37.
94. Thiele AG, Weigel JF, Ziesch B, Rohde C, Mutze U, Ceglarek U, et al. Nutritional Changes and Micronutrient Supply in Patients with Phenylketonuria Under Therapy with Tetrahydrobiopterin (BH(4)). *JIMD Rep.* 2013;9:31-40.
95. Aldamiz-Echevarria L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. Anthropometric characteristics and nutrition in a cohort of PAH-deficient patients. *Clin Nutr.* 2014;33(4):702-17.
96. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30(2):145-52.
97. Scaglioni S, Verduci E, Fiori L, Lammardo AM, Rossi S, Radaelli G, et al. Body mass index rebound and overweight at 8 years of age in hyperphenylalaninaemic children. *Acta Paediatr.* 2004;93(12):1596-600.
98. Kanufre VC, Soares RDL, Alves MRA, Aguiar MJB, Starling ALP, Norton RC. Metabolic syndrome in children and adolescents with phenylketonuria. *J Pediatr. (Rio J)* 2015;91(1):98-103.
99. Colome C, Artuch R, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J, Vilaseca M. Is there a relationship between plasma phenylalanine and cholesterol in phenylketonuric patients under dietary treatment? *Clin Biochem.* 2001;34(5):373-6.
100. Couce ML, Vitoria I, Aldamiz-Echevarria L, Fernandez-Marmiesse A, Roca I, Llarena M, et al. Lipid profile status and other related factors in patients with Hyperphenylalaninemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):123.
101. Schulpis KH, Papassotiropoulos I, Tsakiris S, Vounatsou M, Chrousos GP. Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize

- with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism*. 2005;54(10):1350-5.
102. Huemer M, Huemer C, Moslinger D, Huter D, Stockler-Ipsiroglu S. Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(5):694-9.
 103. Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(3):381-98.
 104. Gil Hernández A, Sánchez de Medina Contreras F. Funciones y metabolismo de los nutrientes. En: Angel. Gil, editor. *Tratado de nutrición*. 2º ed. Madrid: Panamerica; 2010. p. 17-42.
 105. Robert M, Rocha JC, van Rijn M, Ahring K, Belanger-Quintana A, MacDonald A, et al. Micronutrient status in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2013;110 Suppl:S6-17.
 106. Stolen LH, Lilje R, Jorgensen JV, Blikrud YT, Almaas R. High dietary folic Acid and high plasma folate in children and adults with phenylketonuria. *JIMD Rep*. 2014;13:83-90.
 107. Zielinska M, Zolkowska J, Przybylska-Kruszewska A, Gladysz D, Korycinska-Chaaban D, Nowacka M, et al. High plasma folate in patients with phenylketonuria. *Pol Merkur Lekarski*. 2016;40(238):223-9.
 108. Lammardo AM, Robert M, Rocha JC, van Rijn M, Ahring K, Belanger-Quintana A, et al. Main issues in micronutrient supplementation in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2013;110 Suppl:S1-5.
 109. Demirdas S, van Spronsen FJ, Hollak CEM, van der Lee JH, Bisschop PH, Vaz FM, et al. Micronutrients, Essential Fatty Acids and Bone Health in Phenylketonuria. *Ann Nutr Metab*. 2017;70(2):111-21.
 110. Huemer M, Fodinger M, Bodamer OA, Muhl A, Herle M, Weigmann C, et al. Total homocysteine, B-vitamins and genetic polymorphisms in patients with classical phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2008;94(1):46-51.
 111. Kose E, Arslan N. Vitamin/mineral and micronutrient status in patients with classical phenylketonuria. *Clin Nutr*. 2018.
 112. Miles LM, Allen E, Clarke R, Mills K, Uauy R, Dangour AD. Impact of baseline vitamin B12 status on the effect of vitamin B12 supplementation on neurologic function in older

- people: secondary analysis of data from the OPEN randomised controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71:1166.
113. Alonso Perte E Varela Moreiras G. Ácido fólico y Vitamina B12. En: Angel Gil, editor. *Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* 2º ed. Madrid: Panamerica; 2010. p. 524-46.
114. Martinez Estrada KM, Cadabal Rodriguez T, Miguens Blanco I, Garcia Mendez L. Neurological signs due to isolated vitamin B12 deficiency. *Semergen.* 2013;39(5):e8-11.
115. Walter JH. Vitamin B12 deficiency and phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S52-4.
116. Vugteveen I, Hoeksma M, Monsen AL, Fokkema MR, Reijngoud DJ, van Rijn M, et al. Serum vitamin B12 concentrations within reference values do not exclude functional vitamin B12 deficiency in PKU patients of various ages. *Mol Genet Metab.* 2011;102(1):13-7.
117. Fuller NJ, Bates CJ, Evans PH, Lucas A. High folate intakes related to zinc status in preterm infants. *Eur J Pediatr.* 1992;151(1):51-3.
118. Wien TN, Pike E, Wisløff T, Staff A, Smeland S, Klemp M. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2012;2(1).
119. Gibson TM, Weinstein SJ, Pfeiffer RM, Hollenbeck AR, Subar AF, Schatzkin A, et al. Pre and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J of Clin Nutr.* 2011;94(4):1053-62.
120. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet.* 2013;381(9871):1029-36.
121. Navarro Alarcón M, Gil Hernández F. Selenio, manganeso, cromo, molibdeno, yodo y otros oligoelementos minoritarios. En: Ángel Gil, editor. *Tratado de Nutrición. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición.* 2º ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 705-34.
122. Evans S, Daly A, MacDonald J, Preece MA, Santra S, Vijay S, et al. The micronutrient status of patients with phenylketonuria on dietary treatment: an ongoing challenge. *Ann Nutr Metab.* 2014;65(1):42-8.

123. Conner TS, Richardson AC, Miller JC. Optimal serum selenium concentrations are associated with lower depressive symptoms and negative mood among young adults. *J Nutr.* 2015;145(1):59-65.
124. Barretto JR, Silva LR, Leite ME, Boa-Sorte N, Pimentel H, Purificacao AC, et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. *Nutr Res.* 2008;28(3):208-11.
125. Gassio R, Artuch R, Vilaseca MA, Fuste E, Colome R, Campistol J. Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology.* 2008;22(4):426-31.
126. Olivares Grohnert M, Castillo Durán C, Uauy Dagach-Imbarach R Cobre y Zinc. En: Angel Gil, editor. *Tratado de Nutrición. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición.* 2ª ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 687-704.
127. Livingstone C. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract.* 2015;30(3):371-82.
128. Fisberg RM, Da Silva-Fernandes ME, Fisberg M, Schmidt BJ. Plasma zinc, copper, and erythrocyte superoxide dismutase in children with phenylketonuria. *Nutrition.* 1999;15(6):449-52.
129. Montoya Parra GA, Singh RH, Cetinyurek-Yavuz A, Kuhn M, MacDonald A. Status of nutrients important in brain function in phenylketonuria: a systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):101.
130. Olivares Grohnert M, Arredondo Olguín M, Pizarro Aguirre F.. Hierro. En: Angel. Gil, editor. *Tratado de Nutrición Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* 2º ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 668-85.
131. Pérez Llamas F Gil Hernández A, Zamora Navarro S. Calcio, fósforo, magnesio y flúor. Metabolismo óseo y su regulación. En: Angel. Gil, editor. *Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* 2º ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 641-67.
132. Martínez Agustín O, Sánchez de Medina López-Huertas F, Suárez Ortega MD. Vitamina D. En: Angel. Gil, editor. *Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* 2º ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 571-92.
133. Hansen KE, Ney D. A systematic review of bone mineral density and fractures in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(6):875-80.

134. Miras A, Boveda MD, Leis MR, Mera A, Aldamiz-Echevarria L, Fernandez-Lorenzo JR, et al. Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab*. 2013;108(3):149-54.
135. Miras A, Freire Corbacho A, Rodriguez Garcia J, Leis R, Aldamiz-Echevarria L, Fraga JM, et al. Utility of bone turnover markers in metabolic bone disease detection in patients with phenylketonuria. *Med Clin (Barc)*. 2015;144(5):193-7.
136. Lage S, Bueno M, Andrade F, Prieto JA, Delgado C, Legarda M, et al. Fatty acid profile in patients with phenylketonuria and its relationship with bone mineral density. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33 Suppl 3:S363-71.
137. Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R, et al. Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(2):202-8.
138. de Groot MJ, Hoeksma M, van Rijn M, Slart RH, van Spronsen FJ. Relationships between lumbar bone mineral density and biochemical parameters in phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab*. 2012;105(4):566-70.
139. Juonala M, Jarvisalo MJ, Maki-Torkko N, Kahonen M, Viikari JS, Raitakari OT. Risk factors identified in childhood and decreased carotid artery elasticity in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation*. 2005;112(10):1486-93.
140. Aggoun Y, Szezepanski I, Bonnet D. Noninvasive Assessment of Arterial Stiffness and Risk of Atherosclerotic Events in Children. *Pediatr Res*. 2005;58:173.
141. Thurn D, Doyon A, Sözeri B, Bayazit AK, Canpolat N, Duzova A, et al. Aortic Pulse Wave Velocity in Healthy Children and Adolescents: Reference Values for the Vicorder Device and Modifying Factors. *Am J Hypertens*. 2015;28(12):1480-8.
142. Lurbe E, Agabiti-Rosei E, Cruickshank JK, Dominiczak A, Erdine S, Hirth A, et al. 2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents. *J Hypertens*. 2016;34(10):1887-920.
143. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2013;31(7):1281-357.
144. Mansia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 ESH-ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the

- management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Blood Press*. 2007;16(3):135-232.
145. Estadella C, Vázquez S, Oliveras A. Rigidez arterial y riesgo cardiovascular. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2010;27(5):203-10.
 146. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-605.
 147. Simon A, Chironi G, Levenson J. Comparative performance of subclinical atherosclerosis tests in predicting coronary heart disease in asymptomatic individuals. *Eur Heart J*. 2007;28(24):2967-71.
 148. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*. 2009;54(5):919-50.
 149. Sforza E, Millasseau S, Hupin D, Barthelemy JC, Roche F. Arterial stiffness alteration and obstructive sleep apnea in an elderly cohort free of cardiovascular event history: the PROOF cohort study. *Sleep Breath*. 2018.
 150. Hvelplund Kristiansen M, Banghøj AM, Laugesen E, Tarnow L. Arterial stiffness in people with Type 2 diabetes and obstructive sleep apnoea. *Diabet Med*. 2018.
 151. Lyle AN, Raaz U. Killing Me Unsoftly: Causes and Mechanisms of Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(2):e1-e11.
 152. Sáez-Perez. Arterial distensibility: one more parameter to evaluate cardiovascular risk. *Medicina de Familia Semergen*. 2008;34:284-90.
 153. Lopes-Vicente WRP, Rodrigues S, Cepeda FX, Jordao CP, Costa-Hong V, Dutra-Marques ACB, et al. Arterial stiffness and its association with clustering of metabolic syndrome risk factors. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:87.
 154. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension*. 2005;46(1):200-4.
 155. Yong K, Mori T, Chew G, Beilin LJ, Puddey I, Watts G, et al. The relationship between pulse pressure and inflammation with left ventricular diastolic dysfunction in chronic kidney disease patients. *Intern Med J*. 2018.

156. Poels MM, Zaccai K, Verwoert GC, Vernooij MW, Hofman A, van der Lugt A, et al. Arterial stiffness and cerebral small vessel disease: the Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2012;43(10):2637-42.
157. Fukuhara M, Matsumura K, Ansai T, Takata Y, Sonoki K, Akifusa S, et al. Prediction of cognitive function by arterial stiffness in the very elderly. *Circ J*. 2006;70(6):756-61.
158. Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A, Zonderman AB. Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2008;51(1):99-104.
159. Scuteri A, Brancati AM, Gianni W, Assisi A, Volpe M. Arterial stiffness is an independent risk factor for cognitive impairment in the elderly: a pilot study. *J Hypertens*. 2005;23(6):1211-6.
160. Raaz U, Zollner AM, Schellinger IN, Toh R, Nakagami F, Brandt M, et al. Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development. *Circulation*. 2015;131(20):1783-95.
161. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1318-27.
162. Agabiti-Rosei E, Mancia G, O'Rourke MF, Roman MJ, Safar ME, Smulyan H, et al. Central blood pressure measurements and antihypertensive therapy: a consensus document. *Hypertension*. 2007;50(1):154-60.
163. Kracht D, Shroff R, Baig S, Doyon A, Jacobi C, Zeller R, et al. Validating a new oscillometric device for aortic pulse wave velocity measurements in children and adolescents. *Am J Hypertens*. 2011;24(12):1294-9.
164. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in C, Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004;114(2 Suppl 4th Report):555-76.
165. Hidvegi EV, Illyes M, Molnar FT, Cziraki A. Reference values of aortic pulse wave velocity in a large healthy population aged between 3 and 18 years. Reply. *J Hypertens*. 2013;31(2):425-6.

166. Reusz GS, Cseprekal O, Temmar M, Kis E, Cherif AB, Thaleb A, et al. Reference values of pulse wave velocity in healthy children and teenagers. *Hypertension*. 2010;56(2):217-24.
167. Reusz GS, Shroff R, Kis E, Cseprekal O, Fischer DC, Haffner D. Reference values of aortic pulse wave velocity in a large healthy population aged between 3 and 18 years. *J Hypertens*. 2013;31(2):424-5.
168. Reference Values for Arterial Stiffness C. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010;31(19):2338-50.
169. Janner JH, Godtfredsen NS, Ladelund S, Vestbo J, Prescott E. Aortic augmentation index: reference values in a large unselected population by means of the SphygmoCor device. *Am J Hypertens*. 2010;23(2):180-5.
170. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Noninvasive assessment of endothelial function in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(1):80-90.
171. Hemida Ameijeiras A LPJ, Calvo Gómez C. Medida no invasiva de la presión arterial central mediante tonometría por aclaramiento. *Análisis de la onda de pulso*. *Galicía Clin*. 2012;73(4):161-8.
172. Weber T, Auer J, O'Rourke M F, Kvas E, Lassnig E, Lamm G, et al. Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2005;26(24):2657-63.
173. Jiang XJ, O'Rourke MF, Zhang YQ, He XY, Liu LS. Superior effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor over a diuretic for reducing aortic systolic pressure. *J Hypertens*. 2007;25(5):1095-9.
174. Klingbeil AU, John S, Schneider MP, Jacobi J, Handrock R, Schmieder RE. Effect of AT1 receptor blockade on endothelial function in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2003;16(2):123-8.
175. Jatoi NA, Mahmud A, Bennett K, Feely J. Assessment of arterial stiffness in hypertension: comparison of oscillometric (Arteriograph), piezoelectronic (Complior) and tonometric (SphygmoCor) techniques. *J Hypertens*. 2009;27(11):2186-91.
176. London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME. Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension*. 2001;38(3):434-8.

177. Boggia J LL, Lujambio I, Sottolano M, Noboa O. Hipertensión Arterial. Fisiopatología, Mecanismos de las disfunciones Orgánicas. 1. FEFMUR ed. Montevideo. p. 255-324.
178. Bramell JC HA. The velocity of the pulse wave in man. *Proc R Soc Lond (Biol)*. 1922;93:298-529.
179. Espinoza F, Kunstmann S, Urzúa A, Michea L, Marusic ET, Vukusich A. Daño arterial asociado a la enfermedad renal crónica: evaluación mediante técnicas de laboratorio no invasivo en pacientes hemodializados. *Rev Méd Chile*. 2012;140:153-60.
180. Solanki JD, Mehta HB, Shah CJ. Pulse wave analyzed cardiovascular parameters in young first degree relatives of type 2 diabetics- a cross-sectional study. *Indian Heart J*. 2018;70(3):341-5.
181. Haller MJ, Samyn M, Nichols WW, Brusko T, Wasserfall C, Schwartz RF, et al. Radial artery tonometry demonstrates arterial stiffness in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(12):2911-7.
182. Murkamilov IT, Sabirov IS, Fomin VV, Yusupov FA. Endothelial dysfunction and arterial wall stiffness: New targets in diabetic nephropathy. *Ter Arkh*. 2017;89(10):87-94.
183. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, et al. Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Hypertensive Patients. *Hypertension*. 2001;37(5):1236-41.
184. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of Aortic Stiffness on Survival in End-Stage Renal Disease. *Circulation*. 1999;99(18):2434-9.
185. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of Aortic Stiffness Attenuation on Survival of Patients in End-Stage Renal Failure. *Circulation*. 2001;103(7):987-92.
186. Zhang X, Low S, Sum CF, Tavintharan S, Yeoh LY, Liu J, et al. Arterial stiffness is an independent predictor for albuminuria progression among Asians with type 2 diabetes-A prospective cohort study. *J Diabetes Complications*. 2017;31(6):933-8.
187. Bouchi R, Babazono T, Mugishima M, Yoshida N, Nyumura I, Toya K, et al. Arterial stiffness is associated with incident albuminuria and decreased glomerular filtration rate in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011;34(12):2570-5.
188. Lehmann ED, Watts GF, Gosling RG. Aortic distensibility and hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1992;340(8828):1171-2.

189. Wen JH, Zhong YY, Wen ZG, Kuang CQ, Liao JR, Chen LH, et al. Triglyceride to HDL-C ratio and increased arterial stiffness in apparently healthy individuals. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):4342-8.
190. Cote AT, Harris KC, Panagiotopoulos C, Sandor GG, Devlin AM. Childhood obesity and cardiovascular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(15):1309-19.
191. Guven B, Demirpence S, Yilmazer MM, Carti OU, Tavli V, Mese T, et al. Arterial function and anatomy in obese children with cardiovascular risk factors. *Pediatr Int*. 2013;55(6):696-702.
192. Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, et al. Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. *Lancet*. 2001;358(9291):1400-4.
193. Manco M, Nobili V, Alisi A, Panera N, Handberg A. Arterial Stiffness, Thickness and Association to Suitable Novel Markers of Risk at the Origin of Cardiovascular Disease in Obese Children. *Int J Med Sci*. 2017;14(8):711-20.
194. Walter LM, Tamanyan K, Limawan AP, Biggs SN, Weichard AJ, Davey MJ, et al. Overweight and obese children with sleep disordered breathing have elevated arterial stiffness. *Sleep Med*. 2018;48:187-93.
195. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, et al. Changes in Arterial Stiffness and Wave Reflection With Advancing Age in Healthy Men and Women. *The Framingham Heart Study*. 2004;43(6):1239-45.
196. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*. 2012;30(3):445-8.
197. Rocha JC, van Rijn M, van Dam E, Ahring K, Belanger-Quintana A, Dokoupil K, et al. Weight Management in Phenylketonuria: What Should Be Monitored. *Ann Nutr Metab*. 2016;68(1):60-5.
198. Robertson LV, McStravick N, Ripley S, Weetch E, Donald S, Adam S, et al. Body mass index in adult patients with diet-treated phenylketonuria. *J Hum Nutr Diet*. 2013;26 Suppl 1:1-6.
199. Burrage LC, McConnell J, Haesler R, O'Riordan MA, Sutton VR, Kerr DS, et al. High prevalence of overweight and obesity in females with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2012;107(1-2):43-8.

200. AECOM. Guía práctica para el diagnóstico, tratamiento y registro de pacientes con hiperfenilalaninemia en España. Madrid: Servicios editoriales SL; 2011.
201. Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, Mofidi S, Steiner R, DeVincentis E, et al. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc.* 2003;103(9):1167-73.
202. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1995;854:1-452.
203. Group WHOMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl.* 2006;450:76-85.
204. Tojo Sierra R, Leis Trabazo L. Estudio Galinut. Valores estándar de Galicia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela 999.
205. Zimmet P, MM Alberti KG, Serrano Ríos M. A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results. *Rev Esp Cardiol.* 2005;58(12):1371-6.
206. Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension.* 2001;38(4):932-7.
207. Hanley WB, Feigenbaum A, Clarke JT, Schoonheydt W, Austin V. Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria. *Lancet.* 1993;342(8877):997.
208. Simon E, Schwarz M, Roos J, Dragano N, Geraedts M, Siegrist J, et al. Evaluation of quality of life and description of the sociodemographic state in adolescent and young adult patients with phenylketonuria (PKU). *Health Qual Life Outcomes.* 2008;6:25.
209. Alptekin IM, Koc N, Gunduz M, Cakiroglu FP. The impact of phenylketonuria on PKU patients' quality of life: Using of the phenylketonuria-quality of life (PKU-QOL) questionnaires. *Clin Nutr ESPEN.* 2018;27:79-85.
210. van Spronsen FJ, Huijbregts SC, Bosch AM, Leuzzi V. Cognitive, neurophysiological, neurological and psychosocial outcomes in early-treated PKU-patients: a start toward standardized outcome measurement across development. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S45-51.

211. Ahring K, Bélanger-Quintana A, Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, Lammardo AM, MacDonald A, et al. Blood phenylalanine control in phenylketonuria: a survey of 10 European centres. *Eur J Clin Nutr.* 2010;65:275.
212. Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. Tetrahydrobiopterin therapy vs phenylalanine-restricted diet: Impact on growth in PKU. *Mol Genet Metab.* 2013;109(4):331-8.
213. Hvas AM, Nexø E, Nielsen JB. Vitamin B12 and vitamin B6 supplementation is needed among adults with phenylketonuria (PKU). *J Inher Metab Dis.* 2006;29(1):47-53.
214. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr.* 2000;136(4):545-7.
215. Schulpis KH, Karikas GA, Papakonstantinou E. Homocysteine and other vascular risk factors in patients with phenylketonuria on a diet. *Acta Paediatr.* 2002;91(8):905-9.
216. MacDonald A, Lee P, Davies P, Daly A, Lilburn M, Gokmen Ozel H, et al. Long-term compliance with a novel vitamin and mineral supplement in older people with PKU. *J Inher Metab Dis.* 2008;31(6):718-23.
217. Wiig I, Motzfeldt K, Loken EB, Kase BF. Nutritional Consequences of Adhering to a Low Phenylalanine Diet for Late-Treated Adults with PKU: Low Phe Diet for Adults with PKU. *JIMD Rep.* 2013;7:109-16.
218. Andrade F, Lopez-Suarez O, Llarena M, Couce ML, Aldámiz-Echevarría L. Influence of phenylketonuria's diet on dimethylated arginines and methylation cycle. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(27):e7392.
219. Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural Tube Defects. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva 2015.
220. Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(3):429-36.
221. Lambruschini N, Perez-Duenas B, Vilaseca MA, Mas A, Artuch R, Gassio R, et al. Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S54-60.

222. Fenton TR, Tough SC, Lyon AW, Eliasziw M, Hanley DA. Causal assessment of dietary acid load and bone disease: a systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality. *Nutr J.* 2011;10:41.
223. Hannan MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2000;15(12):2504-12.
224. Acosta PB, Yannicelli S, Singh RH, Elsas LJ, 2nd, Mofidi S, Steiner RD. Iron status of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy assessed by transferrin receptors. *Genet Med.* 2004;6(2):96-101.
225. Schulpis KH, Papastamataki M, Stamou H, Papassotiriou I, Margeli A. The effect of diet on total antioxidant status, ceruloplasmin, transferrin and ferritin serum levels in phenylketonuric children. *Acta Paediatr.* 2010;99(10):1565-70.
226. Soriano JB, Rojas-Rueda D, Alonso J, Anto JM, Cardona PJ, Fernandez E, et al. The burden of disease in Spain: Results from the Global Burden of Disease 2016. *Med Clin (Barc).* 2018;151(5):171-90.
227. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension.* 2018;71(6):1269-324.
228. O'Rourke MF, Staessen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens.* 2002;15(5):426-44.
229. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):554-66.
230. Safar ME. De-stiffening drug therapy and blood pressure control. *Integr Blood Press Control.* 2010;3:1-9.
231. Hidvegi EV, Illyes M, Benczur B, Bocskei RM, Ratgeber L, Lenkey Z, et al. Reference values of aortic pulse wave velocity in a large healthy population aged between 3 and 18 years. *J Hypertens.* 2012;30(12):2314-21.

232. Rocha JC, van Spronsen FJ, Almeida MF, Soares G, Quelhas D, Ramos E, et al. Dietary treatment in phenylketonuria does not lead to increased risk of obesity or metabolic syndrome. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):659-63.
233. Huemer M, Simma B, Mayr D, Moslinger D, Muhl A, Schmid I, et al. Free asymmetric dimethylarginine (ADMA) is low in children and adolescents with classical phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(5):817-21.
234. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation.* 2006;113(5):664-70.
235. Kanufre VC, Soares RD, Alves MR, Aguiar MJ, Starling AL, Norton RC. Metabolic syndrome in children and adolescents with phenylketonuria. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(1):98-103.
236. Rocha JC, MacDonald A, Trefz F. Is overweight an issue in phenylketonuria? *Mol Genet Metab.* 2013;110 Suppl:S18-24.
237. Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, Lammardo AM, Motzfeldt K, Robert M, Rocha JC, et al. Optimising growth in phenylketonuria: current state of the clinical evidence base. *Clin Nutr.* 2012;31(1):16-21.
238. Couce ML, Guler I, Anca-Couce A, Lojo M, Miras A, Leis R, et al. New insights in growth of phenylketonuric patients. *Eur J Pediatr.* 2015;174(5):651-9.
239. Belanger-Quintana A, Martinez-Pardo M. Physical development in patients with phenylketonuria on dietary treatment: a retrospective study. *Mol Genet Metab.* 2011;104(4):480-4.
240. Moretti F, Pellegrini N, Salvatici E, Rovelli V, Banderali G, Radaelli G, et al. Dietary glycemic index, glycemic load and metabolic profile in children with phenylketonuria. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27(2):176-82.
241. Couce ML, Sanchez-Pintos P, Vitoria I, De Castro MJ, Aldamiz-Echevarria L, Correcher P, et al. Carbohydrate status in patients with phenylketonuria. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):103.
242. Aldamiz-Echevarria L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. 6R-tetrahydrobiopterin treated PKU patients below 4 years of age: Physical outcomes, nutrition and genotype. *Mol Genet Metab.* 2015;115(1):10-6.

243. Sutton-Tyrrell K, Newman A, Simonsick EM, Havlik R, Pahor M, Lakatta E, et al. Aortic stiffness is associated with visceral adiposity in older adults enrolled in the study of health, aging, and body composition. *Hypertension*. 2001;38(3):429-33.
244. Resnick LM, Militianu D, Cunnings AJ, Pipe JG, Evelhoch JL, Soulen RL. Direct magnetic resonance determination of aortic distensibility in essential hypertension: relation to age, abdominal visceral fat, and in situ intracellular free magnesium. *Hypertension*. 1997;30(3 Pt 2):654-9.
245. Dengo AL, Dennis EA, Orr JS, Marinik EL, Ehrlich E, Davy BM, et al. Arterial destiffening with weight loss in overweight and obese middle-aged and older adults. *Hypertension*. 2010;55(4):855-61.
246. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res*. 2000;87(7):566-73.
247. Verduci E, Banderali G, Moretti F, Lassandro C, Cefalo G, Radaelli G, et al. Diet in children with phenylketonuria and risk of cardiovascular disease: A narrative overview. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(3):171-7.
248. Schulpi KH, Scarpalezou A. Triglycerides, cholesterol, HDL, LDL, and VLDL cholesterol in serum of phenylketonuric children under dietary control. *Clin Pediatr (Phila)*. 1989;28(10):466-9.
249. Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, et al. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta*. 2013;416:54-9.
250. Castillo M, Zafra MF, Garcia-Peregrin E. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res*. 1988;13(6):551-5.



TRABAJOS PUBLICADOS





Artículo 1: Vitamin and mineral status in patients with hyperphenylalaninemia.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719215300299?via%3Dihub>





Artículo 2: Micronutrient in hyperphenylalaninemia.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340915001456?via%3Dihub>





Articulo 3: Arterial stiffness assessment in patients with phenylketonuria.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5758209/>



